



**HAL**  
open science

# Production de bioéthanol à partir d'hydrolysats enzymatiques de substrats (ligno)cellulosiques prétraités par des liquides ioniques

Ranim Alayoubi

## ► To cite this version:

Ranim Alayoubi. Production de bioéthanol à partir d'hydrolysats enzymatiques de substrats (ligno)cellulosiques prétraités par des liquides ioniques. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne; Université Libanaise, 2019. Français. NNT : 2019AMIE0009 . tel-03640521

**HAL Id: tel-03640521**

**<https://theses.hal.science/tel-03640521v1>**

Submitted on 13 Apr 2022

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

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

# Thèse de Doctorat

*Mention Biologie  
Spécialité Biochimie et Génie Cellulaire*

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585) de  
l'Université de Picardie Jules Verne*  
et  
*à l'Ecole doctorale en Sciences et Technologie  
de l'Université Libanaise*

par

**Ranim ALAYOUBI**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Production de bioéthanol à partir d'hydrolysats  
enzymatiques de substrats (ligno)cellulosiques prétraités par  
des liquides ioniques***

Soutenue le 20 juin 2019, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

<b>M<sup>me</sup> Caroline Rémond</b> , Professeur, <i>Univ. de Reims Champagne-Ardenne</i>	Présidente
<b>M<sup>me</sup> Françoise Ergan</b> , Professeur, <i>Le Mans Univ.</i>	Rapporteur
<b>M. André Pauss</b> , Professeur, <i>Univ. de Technologie de Compiègne</i>	Rapporteur
<b>M. Jihad Attieh</b> , Professeur, <i>Univ. de Balamand (Liban)</i>	Examineur
<b>M<sup>me</sup> Catherine Sarazin</b> , Professeur, <i>Univ. de Picardie Jules Verne</i>	Directrice de thèse
<b>M<sup>me</sup> Isabelle Gosselin</b> , Maître de Conférences, <i>Univ. de Picardie Jules Verne</i>	Co-encadrante
<b>M. Mohamad Tabcheh</b> , Professeur, <i>Univ. Libanaise</i>	Directeur de thèse
<b>M. Achraf Kouzayha</b> , Maître de Conférences, <i>Univ. Libanaise</i>	Co-encadrant
<b>M. Eric Gontier</b> , Professeur, <i>Univ. de Picardie Jules Verne</i>	Invité

*A ma famille,*

## Remerciements

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Picardie Jules Verne (UPJV) et l'Université Libanaise (UL). Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire (UMR 7025 CNRS - UPJV). Mes sincères remerciements vont donc en premier lieu, à ma directrice de thèse, M<sup>me</sup> Catherine Sarazin, Professeur (UPJV), pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci pour tes remarques enrichissantes, tes conseils toujours utiles et pour ta participation judicieuse dans l'élaboration de ce manuscrit. Je tiens à remercier également vivement, ma co-directrice de thèse, M<sup>me</sup> Isabelle Gosselin, Maître de conférences (UPJV), pour son encadrement scientifique avisé, sa disponibilité et ses critiques pertinentes et constructives pour l'avancée de la thèse. Je tiens à exprimer toute ma profonde reconnaissance pour tout le temps que tu m'as consacré tout au long de cette période malgré tes prérogatives, pour le suivi consciencieux des travaux de recherche et les nombreux encouragements que tu m'as prodigués. Ta rigueur scientifique, ton dynamisme et ton investissement m'ont été d'une aide très précieuse et notamment pour la rédaction de ce manuscrit.

Mes sincères remerciements sont également adressés à mon directeur de thèse (UL), M. Mohamad Tabcheh, Professeur, et mon co-directeur de thèse (UL), M. Achraf Kouzayha, Maître de conférences, pour leur encadrement, leur soutien, leurs conseils très utiles et leur encouragement durant ces trois années de thèse.

J'adresse tous mes remerciements à tous les membres du jury de thèse d'avoir bien voulu évaluer ce travail de recherche : M<sup>me</sup> Françoise Ergan, Professeur à Le Mans Université, M. André Pauss, Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne, en tant que rapporteurs et M<sup>me</sup> Caroline Rémond, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, M. Jihad Attieh, Professeur à l'Université de Balamand, en tant qu'examineurs et M. Eric Gontier, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne, en tant que membre invité. Merci pour l'intérêt que vous avez porté pour ce travail, pour votre lecture attentive du manuscrit ainsi que pour vos questions et remarques très intéressantes.

Je tiens aussi à remercier M<sup>me</sup> Virginie Lambertyn, Technicienne (UPJV) pour son assistance et ses compétences en techniques analytiques qu'elle m'a apportées ainsi que pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie sans exception tous les membres du laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire pour leur sympathie et leur bonne humeur. Un grand merci à mes collègues du bureau devenus amis durant ces années : Nely, Pacho, Gaël, et plus tard Claudia pour la bonne ambiance qui règne et qui donne envie d'y rester avec bien sûr la contribution de Josip et Maria-Emilia. « Chicos », les repas, les pauses ainsi que les sorties et les voyages partagés ensemble ont rendu ces années beaucoup plus agréables.

Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette aventure et ceux qui m'ont soutenu jusqu'au bout et qui ne sont pas nommés car la liste serait trop longue mais ils se reconnaîtront, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux vont à mes chers parents, ma sœur et mes frères, qui ont fortement cru en moi et qui n'ont cessé de me motiver depuis si longtemps. Merci maman pour ton soutien, ta confiance, ta tendresse et ton amour inconditionnel, tu m'as accompagnée tout au long de cette période, malgré la distance par tes pensées et tes appels téléphoniques très fréquents. Papa, tu as semé en moi depuis que j'étais toute petite l'envie d'aller toujours de l'avant rien qu'en me donnant l'exemple. Je sais bien que la concrétisation de ce doctorat te tenait particulièrement à cœur mais malheureusement tu n'es plus là pour me voir le réaliser. Cet aboutissement, je te le dédie en témoignage de ma profonde affection. J'espère avoir été digne de la confiance que tu m'avais accordée et que ce travail est à la hauteur de tes espérances.

## Liste des abréviations

AA : Auxiliary activity

Acétyl CoA: Acétyl coenzyme A

ADF: Acid detergent fiber

AF : Acide formique

AL : Acide lévulinique

[Amim][Cl] : 1-allyl-3-méthylimidazolium chlorure

ATP: Adénosine triphosphate

Bioéthanol 2G : Bioéthanol deuxième génération

BLC : Biomasse lignocellulosique

[Bmim][Cl] : 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure

[Bmim][OFm] : 1-butyl-3-méthylimidazolium formate

[Bmim][PF<sub>6</sub>] : 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate

BSG : Brewer's spent grain

[(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> [NO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> : Ethylammonium nitrate

[C<sub>n</sub>mim][Cl] : 1-alkyl-3-méthylimidazolium chlorure

CAZymes : Carbohydrate-active enzymes

CBD : Carbohydrate (cellulose) binding domain

CBH : Cellobiohydrolases

CE : Carbohydrate estérase

CMI : Concentration minimale inhibitrice

cP : Centipoise

DA : Degré d'acétylation

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO<sub>600nm</sub> : Densité optique à 600 nm

DP : Degré de polymérisation

[Emim][BF<sub>4</sub>] : 1-éthyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate

[Emim][EtSO<sub>4</sub>] : 1-éthyl-3-méthyl-imidazolium éthyl sulfate

[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] : 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate

[Emim][OAc] : 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate  
FAD : Flavine adénine dinucléotide  
FADH<sub>2</sub> : Flavine adénine dinucléotide réduite  
FT-IR : Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier  
GH : Glycosides hydrolases  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : Acide phosphorique  
HCl : Acide chlorhydrique  
HMF: Hydroxyméthylfurfural  
HNO<sub>3</sub> : Acide nitrique  
HPLC: High performance liquid chromatography  
LI : Liquide ionique  
LPMOs : Lytic polysaccharide monooxygenases  
MEB : Microscopie électronique à balayage  
MET : Microscopie électronique en transmission  
NaCl : Chlorure de sodium  
NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée  
NADH+H<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide réduite  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite  
NDF : Neutral detergent fiber  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
RTILs : Room temperature ionic liquids  
SHF : Separate hydrolysis and fermentation  
SSF : Simultaneous saccharification and fermentation  
TFA : Acide trifluoroacétique  
XDH : Xylitol déshydrogénase  
XR : Xylose réductase

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Etude Bibliographique</b> .....	<b>6</b>
<b>1. La Biomasse lignocellulosique (BLC)</b> .....	<b>6</b>
1.1. Les principales sources .....	6
1.1.1. Les résidus forestiers.....	6
1.1.2. Les résidus agricoles .....	8
1.1.3. Les biomasses herbacées .....	8
1.1.4. Les déchets organiques municipaux.....	9
1.2. Structure et principaux constituants de la paroi végétale .....	10
1.2.1. Cellulose .....	15
1.2.2. Hémicelluloses.....	17
1.2.3. Lignines .....	22
1.2.4. Autres constituants .....	24
1.3. Valorisation des principaux constituants de la biomasse lignocellulosique .....	25
1.3.1. Cellulose : Valorisation en bioéthanol deuxième génération (2G) .....	25
1.3.1.1. <i>Présentation générale</i> .....	25
1.3.1.2. <i>Bioéthanol de deuxième génération</i> .....	26
1.3.1.3. <i>Avantages du bioéthanol de deuxième génération</i> .....	27
1.3.1.4. <i>Autres molécules à haute valeur ajoutée à partir de la cellulose</i> .....	29
1.3.2. Hémicelluloses.....	30
1.3.3. Lignines .....	32
<b>2. Hydrolyse in vitro de la cellulose et des hémicelluloses</b> .....	<b>33</b>
2.1. Hydrolyse chimique .....	33
2.2. Hydrolyse enzymatique .....	35
2.2.1. Hydrolyse enzymatique de la cellulose (Saccharification) .....	35
2.2.1.1. <i>Les glycosides hydrolases</i> .....	36
2.2.1.2. <i>Les enzymes accessoires</i> .....	39
2.2.1.3. <i>Paramètres affectant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose</i> ...41	
2.2.2. Hydrolyse enzymatique des hémicelluloses .....	42
2.2.2.1. <i>Hydrolyse enzymatique des xylanes</i> .....	43
2.2.2.2. <i>Hydrolyse enzymatique des mannanes</i> .....	50
<b>3. Prétraitement de la (ligno)cellulose</b> .....	<b>51</b>

3.1.	Objectifs et différentes techniques.....	51
3.2.	Prétraitements aux liquides ioniques (LI).....	53
3.2.1.	Généralités .....	53
3.2.2.	Solubilisation de la cellulose dans les liquides ioniques .....	56
3.2.3.	Solubilisation de la biomasse lignocellulosique dans les liquides ioniques .....	60
3.2.4.	Régénération de la (ligno)cellulose solubilisée et effet du prétraitement .....	61
3.2.5.	Effet de la température .....	64
3.2.6.	Liquides ioniques et enzymes.....	66
<b>4.</b>	<b>Production de bioéthanol 2G par voie fermentaire .....</b>	<b>69</b>
4.1.	Caractéristiques et morphologie des levures.....	69
4.2.	Structure cellulaire des levures.....	71
4.2.1.	Paroi cellulaire .....	71
4.2.2.	Espace périsplasmique.....	73
4.2.3.	Membrane cytoplasmique et cytoplasme.....	73
4.2.4.	Noyau .....	74
4.3.	Les exigences nutritionnelles.....	74
4.4.	Métabolisme .....	76
4.4.1.	Métabolisme oxydatif .....	76
4.4.1.1.	<i>La glycolyse</i> .....	77
4.4.1.2.	<i>Le nœud métabolique du pyruvate</i> .....	79
4.4.1.3.	<i>Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative</i> .....	81
4.4.1.4.	<i>La voie des pentoses phosphates</i> .....	82
4.4.2.	Métabolisme fermentaire .....	83
4.4.3.	Métabolisme oxydo-réductif – effet Crabtree .....	84
4.4.4.	Métabolisme des hexoses .....	85
4.4.5.	Métabolisme des disaccharides .....	86
4.4.6.	Métabolisme des pentoses .....	87
4.5.	Levures et liquides ioniques .....	90
4.6.	Stratégies d'hydrolyse enzymatique et de fermentation .....	92
4.6.1.	SHF : Separate Hydrolysis and Fermentation.....	93
4.6.2.	SSF : Simultaneous Saccharification and Fermentation .....	93
4.6.3.	SScoF ou SSCF : Saccharification et Co-Fermentation Simultanées...94	
	<b>Chapitre II : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>95</b>
<b>1.</b>	<b>Matériels.....</b>	<b>95</b>

1.1.	Substrats (ligno)cellulosiques .....	95
1.2.	Liquides ioniques.....	96
1.3.	Enzymes.....	97
1.4.	Levures et milieux de culture.....	97
<b>2.</b>	<b>Prétraitement par liquide ionique.....</b>	<b>98</b>
<b>3.</b>	<b>Hydrolyse enzymatique.....</b>	<b>99</b>
3.1.	Cellulose modèle moyennes fibres.....	99
3.2.	Xylane modèle.....	100
3.3.	Cellulose & xylane .....	100
3.4.	Substrats lignocellulosiques : saule blanc et son de blé désamidonné .....	101
<b>4.</b>	<b>Fermentation éthanolique.....</b>	<b>101</b>
4.1.	Monosaccharides ou cellobiose.....	101
4.2.	Substrats modèles et lignocellulosiques.....	103
4.2.1.	Cellulose moyennes fibres.....	103
4.2.1.1.	<i>Procédé séquentiel, SHF</i> .....	103
4.2.1.2.	<i>Procédé simultané, SSF</i> .....	105
4.2.2.	Xylane.....	106
4.2.2.1.	<i>Procédé séquentiel, SHF</i> .....	107
4.2.2.2.	<i>Procédé simultané, SSF</i> .....	107
4.2.3.	Cellulose moyennes fibres & xylane .....	108
4.2.3.1.	<i>Procédé séquentiel, SHF</i> .....	108
4.2.3.2.	<i>Procédé simultané, SSF</i> .....	108
4.2.4.	Echantillons de saule blanc et de son de blé désamidonné.....	109
4.2.4.1.	<i>Procédé séquentiel, SHF</i> .....	109
4.2.4.2.	<i>Procédé simultané, SSF</i> .....	109
<b>5.</b>	<b>Caractérisation de la croissance de levures par mesure de densité optique .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>Quantification des sucres et de l'éthanol par HPLC .....</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>Composition chimique des substrats lignocellulosiques .....</b>	<b>113</b>
7.1.	Teneur en hémicellulose .....	114
7.2.	Teneur en cellulose .....	114
7.3.	Teneur en lignines.....	115
7.4.	Teneur en cendres .....	115
<b>8.</b>	<b>Caractérisation structurale des substrats (ligno)cellulosiques par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.....</b>	<b>116</b>
<b>9.</b>	<b>Caractérisation morphologique des substrats (ligno)cellulosiques .....</b>	<b>117</b>

## Résultats et Discussion

### Chapitre III : Etude de la fermentation éthanolique par des levures à partir des substrats glucidiques constitutifs de la biomasse lignocellulosique ..... 118

<b>1. Introduction</b> .....	118
<b>2. Cultures des levures sur hexoses</b> .....	120
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	120
2.1.1. Conditions aérobies .....	120
2.1.1.1. Sur glucose, galactose ou mannose .....	120
2.1.1.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose .....	123
2.1.2. Conditions anaérobies .....	125
2.1.2.1. Sur glucose, galactose ou mannose .....	125
2.1.2.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose .....	127
2.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	129
2.2.1. Conditions aérobies .....	129
2.2.1.1. Sur glucose, galactose ou mannose .....	129
2.2.1.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose .....	132
2.2.2. Conditions anaérobies .....	133
2.2.2.1. Sur glucose, galactose ou mannose .....	133
2.2.2.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose .....	135
2.3. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	135
2.3.1. Conditions aérobies .....	136
2.3.2. Conditions anaérobies .....	137
2.4. <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	139
2.4.1. Conditions aérobies .....	139
2.4.2. Conditions anaérobies .....	141
<b>3. Cultures des levures sur pentoses et xylitol</b> .....	143
3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	143
3.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	145
3.3. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	148
3.3.1. Conditions aérobies .....	149
3.3.1.1. Sur xylose, D-arabinose, L-arabinose ou xylitol .....	149
3.3.1.2. Sur mélange de glucose et xylose .....	152
3.3.1.3. Sur mélange de xylose et xylitol.....	154
3.3.2. Sur xylose, D-arabinose ou xylitol en conditions anaérobies .....	156
3.4. <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	158

3.4.1. Conditions aérobies .....	158
3.4.1.1. Sur xylose, D-arabinose, L-arabinose ou xylitol .....	158
3.4.1.2. Sur mélange de glucose et xylose .....	162
3.4.2. Sur xylose, D-arabinose ou xylitol en conditions anaérobies .....	164
<b>4. Cultures des levures sur cellobiose .....</b>	<b>166</b>
<b>5. Effet de faibles concentrations en liquides ioniques sur la croissance et la production d'éthanol par <i>S. stipitis</i> .....</b>	<b>170</b>
5.1. [Emim][OAc] .....	172
5.2. [Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ] .....	174
<b>6. Toxicité des liquides ioniques sur les levures : détermination de la concentration minimale inhibitrice .....</b>	<b>177</b>
<b>7. Conclusion partielle .....</b>	<b>180</b>
7.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	180
7.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	181
7.3. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	182
7.4. <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	183
<b>Chapitre IV : Application à des polymères modèles : étude de la production de bioéthanol à partir de la cellulose et du xylane ....</b>	<b>185</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>185</b>
<b>2. Mise au point du protocole expérimental .....</b>	<b>188</b>
2.1. Température du prétraitement aux LI et hydrolyse enzymatique .....	188
2.2. Effet du xylane et/ou de la lignine sur l'hydrolyse de la cellulose par les cellulases .....	195
2.3. Effet de la cellulose et/ou de la lignine sur l'hydrolyse enzymatique du xylane par les xylanases .....	198
<b>3. Bioconversion de la cellulose après prétraitement aux liquides ioniques .....</b>	<b>201</b>
3.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF .....	201
3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	201
3.1.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	207
3.1.3. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	211
3.1.4. <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	214
3.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF .....	218
3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	218
3.2.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	221

3.2.3. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	223
3.2.4. <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	226
<b>4. Bioconversion du xylane</b> .....	<b>230</b>
4.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF .....	231
4.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF.....	233
<b>5. Bioconversion cellulose &amp; xylane</b> .....	<b>235</b>
5.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF .....	236
5.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF.....	240
<b>6. Conclusion partielle</b> .....	<b>243</b>
<b>Chapitre V : Application à des biomasses lignocellulosiques : influence du prétraitement aux liquides ioniques de résidus forestiers et agricoles sur la production de bioéthanol par des levures.....</b>	<b>245</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>245</b>
<b>2. Composition des substrats lignocellulosiques</b> .....	<b>246</b>
<b>3. Solubilisation des substrats lignocellulosiques dans les liquides ioniques</b> .....	<b>250</b>
<b>4. Hydrolyse enzymatique</b> .....	<b>252</b>
<b>5. Fermentation des hydrolysats enzymatiques des substrats lignocellulosiques par les levures</b> .....	<b>255</b>
5.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF .....	255
5.1.1. Saule blanc.....	256
5.1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	256
5.1.1.2. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	260
5.1.2. Son de blé désamidonné .....	263
5.1.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	263
5.1.2.2. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	267
5.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF.....	270
5.2.1. Saule blanc.....	270
5.2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	270
5.2.1.2. <i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	273
5.2.2. Son de blé désamidonné .....	275

5.2.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	275
5.2.2.2.	<i>Scheffersomyces shehatae</i> .....	277
<b>6.</b>	<b>Conclusion partielle</b> .....	<b>279</b>
	<b>Conclusion générale &amp; Perspectives</b> .....	<b>282</b>
	<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>287</b>
	<b>Annexes</b> .....	<b>315</b>

# *Introduction Générale*

## Introduction générale

Au cours des dernières décennies, la production de carburants et de produits chimiques à partir de ressources renouvelables a gagné de plus en plus d'intérêt. La demande énergétique croissante, notamment dans le secteur du transport, est presque entièrement dépendante des combustibles à base de pétrole. Cette utilisation intensive des ressources fossiles a contribué à l'augmentation d'émission des gaz à effet de serre dans l'atmosphère, au réchauffement de la planète et à des changements du climat global.

Limiter la dépendance aux énergies fossiles et réduire l'émission des gaz polluants sont devenus des défis primordiaux de la société actuelle (Zabed *et al.*, 2017). Afin de relever ces défis, les efforts ont convergé vers la recherche et l'adoption de nouvelles sources de production d'énergie ayant un caractère renouvelable et respectueux de l'environnement de façon durable.

Parmi ces ressources alternatives (solaire, éolienne, géothermique...), la biomasse lignocellulosique (BLC) a été identifiée comme étant la plus prometteuse pour la production de biocarburants, de biomatériaux et de biomolécules. Elle est issue des déchets forestiers et/ou agricoles (bois, pailles et bagasses de canne à sucre...), des déchets ménagers verts (tonte des pelouses, taille des haies...) et des cultures herbacées dédiées (*Miscanthus*, *Switchgrass*...) présentant un intérêt dans les pratiques culturales (rotation des cultures pour régénérer les sols) (Zabed *et al.*, 2016). Les biocarburants englobent entre autres, le biométhanol, le biodiesel, le biohydrogène et le bioéthanol qui, à l'échelle mondiale, est le plus utilisé pour l'alimentation des moteurs des véhicules (Balat, 2011).

Le bioéthanol peut être produit à partir de différents types de végétaux. Les plantes sucrières telles que les betteraves et la canne à sucre, ou amylacées telles que le blé et le maïs, pour ne citer que quelques exemples, peuvent servir de matières premières pour la production de bioéthanol dit de première génération (FitzPatrick *et al.*, 2010). Cependant, l'exploitation des cultures sucrières et amylacées, traditionnellement destinées à l'alimentation, présente certains inconvénients (Galbe and Zacchi, 2002). En effet, la production de bioéthanol à partir de ces ressources entre directement en concurrence avec la production alimentaire, ce qui a pour conséquences, d'une part, la hausse des prix des aliments et d'autre part, le risque du

développement d'une agriculture intensive qui pourrait causer des dégâts considérables sur l'environnement (pollution des eaux, déforestation, etc.) (Pimentel, 2003).

Pour pallier ces problèmes, les recherches ont envisagé une transition vers les biocarburants avancés dits de deuxième génération (dérivés de la BLC) et de troisième génération (dérivés de microalgues). La BLC est le constituant principal de la paroi cellulaire végétale et se trouve donc dans toutes les plantes, y compris dans les parties non comestibles telles que les tiges ou les coques de graines et n'entre pas directement en compétition avec l'alimentation humaine ou animale (Kumar *et al.*, 2008). La BLC est principalement composée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, et renferme donc une grande quantité de polysaccharides, c'est pourquoi l'exploitation de la BLC pour la production de bioéthanol de deuxième génération (2G) présente un intérêt grandissant (Phitsuwan *et al.*, 2013).

Néanmoins, le développement de bioéthanol 2G à partir de la BLC est confronté à plusieurs obstacles. Le sucre ne se trouve pas sous forme libre dans la BLC mais sous forme de cellulose et d'hémicelluloses fortement imbriquées avec la lignine, qui doivent être hydrolysées pour libérer le glucose et les autres sucres fermentescibles qui les constituent. La structure complexe de la lignocellulose lui confère une grande résistance à la dépolymérisation, entravant ainsi l'hydrolyse efficace des polysaccharides. Ainsi, en comparaison de la production du bioéthanol de première génération, une étape préalable de déstructuration de la BLC, appelée prétraitement est une étape cruciale et inévitable du procédé.

La cellulose est un homopolymère cristallin ordonné, formé de résidus de D-glucose liés entre eux par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4, alors que les hémicelluloses se caractérisent par une composition hétérogène largement plus variée que celle de la cellulose. Elles sont composées à la fois d'hexoses (D-glucose, D-galactose et D-mannose) et de pentoses (D-xylose et L-arabinose) mais aussi d'acides glucuroniques (acide  $\alpha$ -D-glucuronique ou acide  $\alpha$ -D-4-O-méthylglucuronique). Quant à la lignine, c'est un polymère aromatique complexe qui est inséré dans l'espace entre la cellulose et l'hémicellulose, et maintient la cohésion de la matrice lignocellulosique.

Diverses techniques de prétraitements de la BLC sont utilisées, basées sur des méthodes physiques (broyage), biologiques (délignification microbienne), chimiques

(acides, bases, liquides ioniques (LI), solvants organiques), ou une combinaison de ces méthodes. Récemment, le prétraitement par des liquides ioniques hydrophiles (LI) a reçu un intérêt particulier grâce à son efficacité à surmonter la récalcitrance de substrats (ligno)cellulosiques, permettant d'accroître très nettement l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique dans des conditions douces. Les LI sont des sels organiques reconnus pour leur stabilité thermique et chimique, leur pression de vapeur négligeable, et dont certains possèdent la particularité d'être liquides à température ambiante d'où le terme de "*Room Temperature Ionic Liquids*" (RTILs).

Pour l'hydrolyse des polysaccharides, les voies biochimiques mettant en œuvre des enzymes permettent la conversion de la cellulose et de l'hémicellulose en hexoses et pentoses sélectivement, dans des conditions douces de température et de pH. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique réduit la formation de coproduits tels que l'hydroxyméthylfurfural et le furfural issus de la dégradation des hexoses et des pentoses, respectivement et qui sont décrits en tant qu'inhibiteurs de l'étape de fermentation.

Les sucres fermentescibles produits lors de l'hydrolyse enzymatique seront fermentés en bioéthanol par des microorganismes, principalement des levures. Différents procédés d'hydrolyse et de fermentation éthanolique existent. Au cours du procédé séquentiel, SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*), l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique sont réalisées en deux étapes séparées ce qui permet ainsi d'optimiser les conditions pour chacune des 2 étapes. Mais ces deux étapes peuvent aussi être réalisées simultanément via un procédé nommé SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

Les études initiales se sont intéressées à la conversion de la cellulose en monomères de glucose en vue de production de bioéthanol 2G mais, actuellement, l'intérêt se concentre de plus en plus sur la co-valorisation des trois constituants de la BLC afin d'augmenter la rentabilité du procédé et le rendre économiquement viable à l'échelle industrielle, obéissant ainsi au concept de bioraffinerie (Ohara, 2003 ; FitzPatrick *et al.*, 2010). Dans cette optique, la création, le développement de produits chimiques nouveaux ou de substitution issus des bioressources renouvelables dans le cadre d'une bioéconomie circulaire sont d'une importance fondamentale, particulièrement après le lancement du plan d'action de la commission européenne en 2015 qui encourage à l'exploitation de ces dernières (Zuin, 2016). Le concept de la bioéconomie circulaire peut être décrit comme un système industriel réparateur ou

régénérateur qui, au contraire du concept linéaire, permettrait la réutilisation des ressources et l'élimination ou la minimisation des déchets, créant ainsi une valeur maximale supplémentaire (Zuin, 2016).

C'est dans ce contexte de bioraffinerie que s'inscrit cette thèse en co-tutelle entre l'Université de Picardie Jules Verne et l'Université Libanaise, réalisée au sein de l'Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire (UMR 7025 CNRS – UPJV) et financée par une bourse doctorale de l'Université Libanaise et l'Association AZM & Saade.

Le sujet porte plus précisément sur la co-valorisation des fractions cellulosique et hémicellulosique de la BLC en bioéthanol 2G dans des conditions douces de pH et de température. Deux liquides ioniques (LI) hydrophiles : le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ont été sélectionnés pour le prétraitement de la cellulose modèle et des deux BLC : des résidus de saule blanc et de son de blé désamidonné. Ce choix de LI pour le prétraitement s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés au sein du laboratoire. Ensuite, l'étape d'hydrolyse des polysaccharides de la BLC est effectuée par des enzymes commerciales : les cellulases de *Trichoderma reesei* et les xylanases de *Trichoderma longibrachiatum*. Enfin, la conversion des sucres fermentescibles en éthanol est réalisée par voie fermentaire par des levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces shehatae* et *Scheffersomyces stipitis*. L'originalité de ce travail réside dans l'abaissement de la température du prétraitement par les LI, en partie afin de réduire l'énergie inhérente au prétraitement et surtout dans la perspective ultérieure de combiner le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique selon un procédé « one pot », impliquant un choix de température de prétraitement proche des conditions optimales des étapes de biocatalyse. Il est aussi envisagé d'étudier l'effet de faibles concentrations en LI sur l'activité des enzymes et la capacité fermentaire des levures.

Ce présent mémoire est réparti en cinq chapitres :

Le premier chapitre est dédié à une étude bibliographique et se décline en quatre sous-parties. La première sous-partie aborde les principales sources de BLC ainsi que ses principaux constituants et leurs différentes voies de valorisation. Dans la deuxième sous-partie, est détaillée l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides constitutifs de

la BLC. Ensuite, la troisième sous-partie est dédiée au prétraitement de la (ligno)cellulose par les LI alors que la dernière sous-partie de ce premier chapitre est consacrée à l'étude de la production d'éthanol par voie fermentaire des levures.

Le deuxième chapitre donne un aperçu sur le matériel et les méthodes expérimentales utilisés dans cette étude.

Le troisième chapitre aborde l'étude de la fermentation éthanolique par les quatre espèces de levures citées ci-dessus et la comparaison de leurs rendements éthanoliques sur monosaccharides (hexoses et pentoses) purs ou en mélange.

Le quatrième chapitre consiste à transposer l'étude à des polymères modèles : cellulose et xylane, en mettant en œuvre l'étape de prétraitement (dans le cas de la cellulose) par les deux LI, l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ensuite l'hydrolyse enzymatique de ces deux polymères a été effectuée par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum*, respectivement. L'étape de fermentation par les levures, a été effectuée soit séquentiellement (SHF), soit simultanément à l'hydrolyse enzymatique (SSF).

Dans le cinquième chapitre, le procédé a été appliqué à deux BLC distinctes par leurs origines et leurs compositions chimiques : le saule blanc (résidu forestier) et le son de blé désamidonné (résidu agricole). Les résidus de saule blanc collectés après élagage sur le site de l'UFR des Sciences de l'UPJV, constituent un déchet forestier sous-exploité, essentiellement comme combustible. Par ailleurs, le son de blé est un coproduit de l'industrie du blé, largement produit et représente une importante source de sucres fermentescibles, riche en xylose, valorisé en alimentation animale (Apprich *et al.*, 2014). Ces deux substrats constituent deux exemples de biomasses différentes pour la production de bioéthanol 2G et d'autres produits à haute valeur ajoutée.

# Chapitre I :

*Etude bibliographique*

# 1. La biomasse lignocellulosique

## 1.1. Les principales sources

La biomasse lignocellulosique (BLC) issue des déchets forestiers et agricoles, constitue une matière première renouvelable et disponible en grandes quantités. La BLC est principalement composée de polysaccharides, plus de 75%, et est considérée comme une source prometteuse de sucres fermentescibles pour la production de biocarburants, de produits chimiques à haute valeur ajoutée et de matériaux biodégradables (Menon and Rao, 2012). Par ailleurs, la production mondiale de biomasse végétale a été estimée à environ 200 milliards de tonnes par an où près de 8 à 20 milliards de tonnes peuvent être utilisés pour la production de biocarburants (Saini *et al.*, 2015 ; Zabed *et al.*, 2016).

Généralement, il est admis que les matériaux lignocellulosiques sont principalement constitués de cellulose (35-50%), d'hémicelluloses (20-35%) et de lignine (15-20%) (Haghighi Mood *et al.*, 2013). Ils peuvent être classés en quatre groupes basés sur le type de ressource : 1) les résidus forestiers regroupant les résineux et les feuillus, 2) les résidus agricoles issus des cultures variées telles que les tiges de maïs, la paille de blé ou de riz ou la bagasse de canne à sucre, 3) les plantes herbacées dédiées à culture rapide telles que le *switchgrass* ou le *Miscanthus* et 4) les composés organiques des déchets municipaux (Sánchez and Cardona, 2008; Sims *et al.*, 2010).

### 1.1.1. Les résidus forestiers

La grande diversité du bois est reflétée par une morphologie et une composition chimique très variées. Les deux composants majoritaires du bois sont les polysaccharides (65 - 75%) et la lignine (18 - 35%), les deux étant des polymères plus ou moins complexes. D'autres composants tels que l'amidon, les pectines, les composés minéraux (déterminés par la teneur en cendres, ash en anglais) et les extractibles (composés de faible poids moléculaire de la paroi externe solubles en solvant ou dans l'eau) sont aussi présents dans le bois mais en quantité moindre et variable. Globalement, le bois a une composition élémentaire d'environ 50% de carbone, 6% d'hydrogène, 44% d'oxygène et des traces de plusieurs ions métalliques (Hon and Shiraishi, 2000). Typiquement, on distingue deux types de bois, les feuillus ou angiospermes, et les résineux ou gymnospermes, tous les deux largement

répandus sur la Terre, des régions tropicales aux régions arctiques (Popescu *et al.*, 2009). Cependant, les résineux présentent une anatomie moins complexe, une densité plus faible et une croissance plus rapide en comparaison avec les feuillus (Zabed *et al.*, 2016). Les résineux sont caractérisés par une structure microscopique uniforme et regroupent les espèces à feuillage persistant telles que l'épicéa, le pin, le cèdre, ou encore le cyprès, ayant des feuilles sous forme d'aiguilles qui se renouvellent au fur et à mesure gardant ainsi le même aspect de l'arbre. On parle ainsi d'arbres toujours-verts (evergreen).

Contrairement aux résineux, les feuillus se caractérisent par une structure macroscopique plus complexe reflétée dans la distribution et la présence de différents types cellulaires (Hon and Shiraishi, 2000). Les feuillus comprenant, entre autres, le chêne, le saule, le hêtre, le peuplier, l'orme sont principalement répandus dans l'hémisphère Nord (Zabed *et al.*, 2016). Ces arbres à feuilles caduques et larges sont appelés feuillus, et perdent leurs feuilles en automne, contrairement aux résineux.

Comparés aux résidus agricoles et aux biomasses herbacées, les résidus forestiers présentent de nombreuses caractéristiques uniques. En effet, les dates de collecte des résidus forestiers sont largement plus flexibles et peuvent se dérouler tout au long de l'année (Zhu and Pan, 2010). C'est pourquoi les résidus forestiers constituent une ressource d'intérêt pour la production de biocarburants particulièrement le bioéthanol. Les rendements potentiels en éthanol ont été estimés à 220-275 L/tonne à partir des résineux et 280-285 L/tonne à partir des feuillus (Zhu *et al.*, 2010 ; Gonzalez *et al.*, 2011 ; Zhu *et al.*, 2011). En outre, il est important d'indiquer que les déchets issus de l'industrie forestière et de la transformation du bois tels que les copeaux de bois, la sciure, la liqueur noire issue de la fabrication du papier et les résidus de récolte comme par exemple les branches et les tiges mortes sont disponibles en grandes quantités déjà collectées et constituent des matières premières à très faible coût pour le développement de bioraffinerie et la production de biocarburant (White, 2010 ; Zabed *et al.*, 2016). En revanche, les résidus forestiers sont caractérisés par une teneur en lignine plus grande que celle des résidus agricoles. Il en résulte une structure plus rigide et récalcitrante à la dégradation particulièrement chez les résineux (Zhu and Pan, 2010 ; Tye *et al.*, 2016). De plus, l'utilisation intensive des ressources forestières pour la production de bioéthanol pourrait augmenter les

risques de déforestation et perturber la biodiversité des forêts (Zhu and Pan, 2010 ; Tye *et al.*, 2016).

### 1.1.2. Les résidus agricoles

Les résidus agricoles représentent une autre source de BLC issue de cultures variées dont les quatre principales sont le maïs, le blé, le riz et la bagasse de canne à sucre (Saini *et al.*, 2015). Ces résidus sont le plus souvent utilisés comme fertilisateurs du sol ou pour l'alimentation animale mais présentent aussi une alternative aux résidus forestiers pour la production de bioéthanol ce qui pourrait réduire les risques de déforestation (Kim and Dale, 2004 ; Limayem and Ricke, 2012).

Bien que la majorité des pailles de blé ou de riz soit produite dans les pays européens et asiatiques, les tiges de maïs et la bagasse de canne à sucre sont majoritairement générés en Amérique (Kumar *et al.*, 2008 ; Zabed *et al.*, 2016 ; Zabed *et al.*, 2017). Par ailleurs, ces résidus représentent des cultures à courte rotation et sont ainsi disponibles régulièrement (Limayem and Ricke, 2012 ; Saini *et al.*, 2015). Dans ce contexte, les résidus provenant de l'ensemble des cultures de céréales ont été estimés à 2802 millions de tonnes/an, mondialement (Zabed *et al.*, 2017).

### 1.1.3. Les biomasses herbacées

La production de bioéthanol issu de la BLC à l'échelle industrielle requiert un approvisionnement fiable et continu en matières premières afin de maintenir un processus de production viable économiquement, tout en maintenant un besoin minimal en eau, en pesticides et en surfaces cultivables. A cet égard, sont considérées les cultures dédiées à croissance rapide telles que le *Miscanthus*, le *switchgrass* ou le Coastal Bermudagrass (Zabed *et al.*, 2017).

Les cultures pérennes ou biomasses herbacées sont facilement cultivées, récoltées et transformées. D'un point de vue environnemental, les biomasses herbacées constituent une matière première alternative de grand intérêt pour la production de bioénergies vu que ces biomasses requièrent de moindres teneurs en pesticides et fertilisateurs (Jørgensen, 2011). De par leur voie de photosynthèse hautement efficace, les cultures pérennes améliorent ainsi la qualité de l'écosystème et se caractérisent par un haut rendement de biomasse par hectare en comparaison avec les biomasses d'origine forestière ou agricole (Lewandowski *et al.*, 2003). Ce qui

résulte en un avantage supplémentaire de valorisation des cultures pérennes sur le plan économique.

En effet, le Coastal Bermudagrass qui est très répandu aux Etats-Unis peut être cultivé dans différentes conditions de sol avec un rendement annuel important compris entre 14,8 et 24,7 tonnes par hectare. Par ailleurs, le *Miscanthus* constitue actuellement une ressource prometteuse en Asie et en Europe. Les cultures de *Miscanthus* développées en Europe peuvent atteindre 2 à 4 mètres en hauteur alors que celles cultivées en Chine atteignent 7 à 10 mètres. De plus, la production mondiale annuelle en *Miscanthus* a été évaluée entre 14,8 et 37,1 tonnes par hectare (Tye *et al.*, 2016). Enfin, le panic érigé (*switchgrass* en anglais) est surtout cultivé en Amérique ainsi qu'en Afrique. Il peut se développer dans une grande variété de sols jusqu'à une hauteur de 3 mètres avec de moindres besoins en pesticides. Globalement, environ 282,9 millions de tonnes de *switchgrass* peuvent être produites annuellement (Tye *et al.*, 2016). Néanmoins, la teneur en cellulose dans le Coastal Bermudagrass est relativement faible (25%) par rapport à celle contenue dans le *Miscanthus* ou le *switchgrass* (40 – 60%) (Tye *et al.*, 2016). Par conséquent, les cultures pérennes de *Miscanthus* et de *switchgrass* représentent une matière première potentiellement disponible pour la production de bioéthanol.

#### 1.1.4. Les déchets organiques municipaux

Après les différentes biomasses d'origine forestière, agricole et herbacée citées plus haut, les déchets organiques municipaux peuvent également représenter une ressource supplémentaire pour l'application dans la bioraffinerie. Ils sont principalement constitués de déchets ménagers, de déchets alimentaires, de déchets verts, et de déchets industriels comme par exemple les boues industrielles et les huiles usagées (Buah *et al.*, 2007 ; Limayem and Ricke, 2012). La production globale mondiale de déchets municipaux a été estimée à 1,3 milliard de tonnes en 1990 et a presque doublé en 2000 avec une valeur de 2,3 milliards de tonnes (Hadar, 2013).

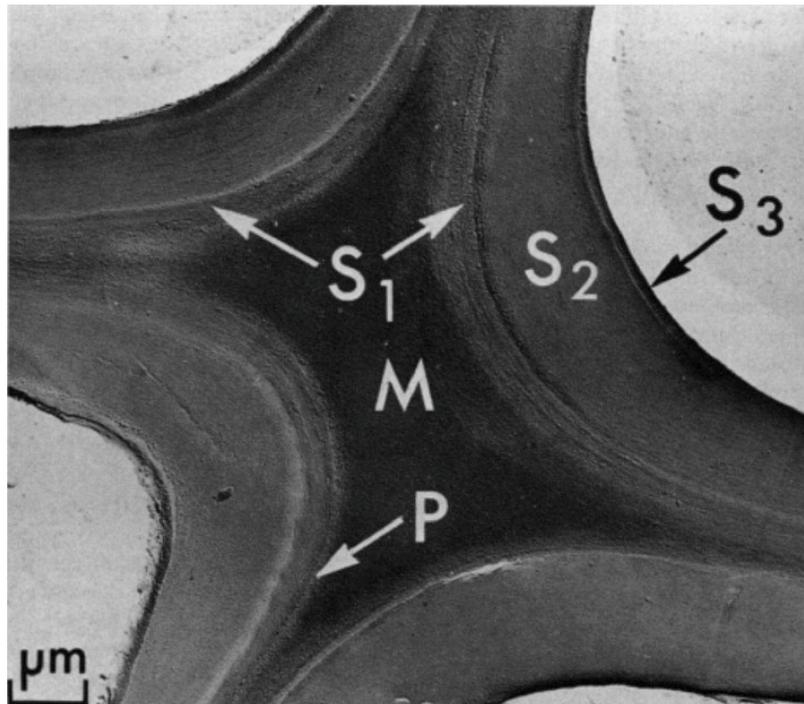
La fraction organique des déchets municipaux est principalement utilisée pour la production de bioéthanol (Li *et al.*, 2012 ; Zabed *et al.*, 2017). Leur utilisation est associée à la gestion et au retraitement des déchets et limiterait ainsi les problèmes environnementaux. Cependant, les déchets municipaux ne pourraient pas être considérés comme matières premières idéales pour la production de bioéthanol en

raison de leur grande diversité en ce qui concerne les composants et la composition et en plus l'existence de contaminations microbiennes (Buah *et al.*, 2007 ; Prasad *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2012).

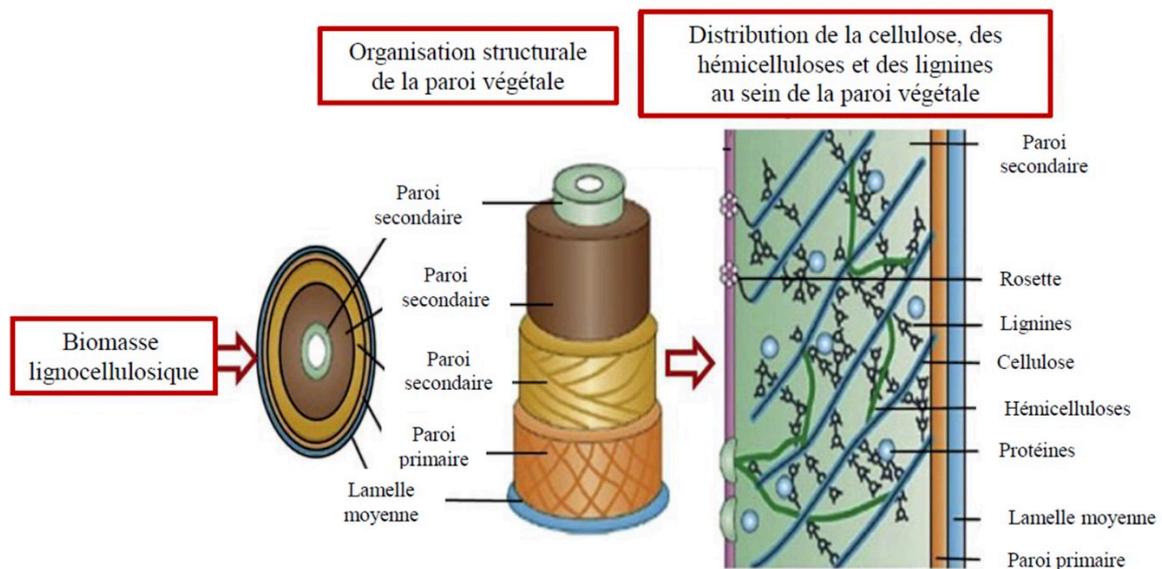
## 1.2. Structure et principaux constituants de la paroi végétale

La paroi végétale représente une structure macromoléculaire complexe constituée principalement d'hydrates de carbone et de composés aromatiques variant en fonction de l'espèce, de l'âge et du tissu considéré (Zhao *et al.*, 2012). Elle fait le lien entre le milieu extracellulaire et le plasmalemme et se caractérise à la fois par une rigidité et un dynamisme. En effet, cette paroi doit être déformable et modelable au rythme de la croissance cellulaire tout en restant rigide pour résister à la pression de turgescence et assurer la cohésion des cellules (Lagaert *et al.*, 2009). La paroi végétale, étant essentielle à la survie de la plante, joue un rôle important en tant que barrière physique contre les pathogènes et les herbivores, mais elle exerce également une activité métabolique (Caffall and Mohnen, 2009 ; Zhao *et al.*, 2012). En effet, la paroi cellulaire est considérée comme un réservoir dynamique de protéines à fonction anti microbienne ainsi que de métabolites secondaires qui inhibent la croissance de nombreux pathogènes, permettant également à la paroi d'assurer son rôle de protection (Darvill and Albersheim, 1984 ; De Lorenzo and Ferrari, 2002 ; Thomma *et al.*, 2002). Dans les tissus, cette paroi associe les cellules entre elles et permet ainsi les échanges intercellulaires ainsi que le passage des substances intervenant dans le métabolisme cellulaire. En plus de conférer la rigidité et la protection aux cellules et de maintenir leur morphologie, la paroi cellulaire permet également de faire face aux chocs osmotiques, à la dessiccation ainsi qu'aux rayons ultraviolets.

La paroi cellulaire végétale s'organise en plusieurs zones distinctes qui de l'extérieur vers l'intérieur correspondent à la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (**Figures I.1 et I.2**).



**Figure I.1.** Vue d'une section transversale d'une cellule végétale mature en microscopie électronique montrant la distribution de la lamelle moyenne (M), de la paroi primaire (P) et de la paroi secondaire (S1, S2, S3) au sein de la paroi cellulaire végétale (d'après Sjöström and Westermark, 1999)



**Figure I.2.** Schéma représentant l'organisation de la BLC (d'après Menon and Rao, 2012)

*La lamelle moyenne* fait le lien direct avec le milieu extérieur et représente la partie commune entre deux cellules végétales voisines. Ainsi, son rôle est d'assurer le maintien de la cohésion avec la paroi de la cellule adjacente. Cette paroi dont

l'épaisseur ne dépasse pas le micromètre est principalement constituée de pectines (Caffall and Mohnen, 2009).

*La paroi primaire* entoure les jeunes cellules en croissance active, elle mesure quelques micromètres d'épaisseur. Elle se caractérise par un grand degré d'élasticité et subit un remodelage parfois considérable, notamment pendant la croissance des organes (Caffall and Mohnen, 2009). En outre, la paroi primaire est impliquée dans l'intégrité structurale de la paroi, l'adhésion cellulaire et la transduction du signal (Caffall and Mohnen, 2009). Deux types de paroi primaire sont distingués : le type I, présent chez les dicotylédones, consiste en proportions égales de cellulose (30%) et d'hémicelluloses (30%) enchevêtrées dans une matrice de pectines (30 à 35%), avec moins de 10% de protéines structurales (Lagaert *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2012). Cependant, le type II se trouve dans les céréales et autres herbacées (monocotylédones graminées) où la cellulose (~25%) est interconnectée à une matrice d'hémicelluloses (~55%) (principalement les glucuronoarabinoxylanes) dépourvue (ou avec très peu) de pectines et de protéines structurales (Vorwerk *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2012).

Les pectines, polysaccharides se structurant sous forme d'un gel, correspondent à la fraction de la paroi végétale riche en acides galacturoniques (Vorwerk *et al.*, 2004). La structure principale des pectines est constituée de chaînes d'acides D-galacturoniques liées en  $\alpha$ -(1,4) et de L-rhamnose liées en  $\alpha$ -(1,2) branchés par des chaînes latérales de nature diverse principalement des galactanes, des arabinanes et des arabinogalactanes (Ridley *et al.*, 2001). En outre, les fonctions acides de certains résidus sont souvent estérifiées par des groupements méthyles, d'où la grande diversité de ces polymères (O'Neill *et al.*, 1990 ; Vorwerk *et al.*, 2004 ; Lagaert *et al.*, 2009).

Dans la paroi primaire, les microfibrilles de cellulose sont déposées aléatoirement selon une orientation qui se fait plus au moins au hasard. Ces microfibrilles rigides et cristallines sont enchâssées dans une matrice amorphe composée majoritairement de pectines (notamment chez les dicotylédones) et/ou d'hémicelluloses (Vorwerk *et al.*, 2004 ; Caffall and Mohnen, 2009).

*La paroi secondaire* s'ajoute à la paroi primaire une fois que la croissance de la cellule est achevée. La formation de la paroi secondaire est caractéristique des cellules

spécialisées qui ont entamé leur maturation notamment chez les plantes vasculaires (Keegstra, 2010). Cette paroi est plus épaisse et plus rigide que la paroi primaire et se divise en une lamelle externe, moyenne et interne. Cette décomposition est établie en fonction de l'orientation des microfibrilles de cellulose qui varie d'une zone à une autre (Zhao *et al.*, 2012). Sa composition chimique est différente de celle de la paroi primaire. En effet, la paroi secondaire contient jusqu'à 45% de cellulose, un peu moins d'hémicellulose et se caractérise par la présence de lignine (jusqu'à 35%). De par son caractère hydrophobe, la présence de la lignine dans les vaisseaux conducteurs de la sève assure ainsi leur imperméabilité. Par conséquent, l'arrangement de fibrilles de cellulose réticulées à l'hémicellulose ou encore aux pectines et enchâssées dans la lignine est responsable de la complexité et la rigidité de la paroi cellulaire végétale (Zhao *et al.*, 2012).

Les proportions des constituants majoritaires de divers substrats lignocellulosiques sont regroupées dans le **Tableau I.1**.

**Tableau I.1.** Composition chimique de divers substrats lignocellulosiques (% MS)

BLC	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines	Références
<i>Feuillus</i>	45 - 47	20 - 30	20 - 25	(McKendry, 2002)
Peuplier	45 - 51	25 - 28	10 - 21	(Torget and Teh-An, 1994)
Chêne rouge	43,4	18,9	25,8	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
Erable	44,9	17,3	20,7	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
<i>Résineux</i>	40 - 50	25 - 30	27 - 30	(McKendry, 2002)
Epicéa	48,5	26,1	28,4	(Shafiei <i>et al.</i> , 2010)
Eucalyptus	48	14,5	29	(Alves <i>et al.</i> , 2010)
Pin	45,5	19	26	(Menon et Rao, 2012)
<i>Biomasses herbacées</i>	25 - 50	20 - 50	10 - 30	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
Tiges de maïs	38 - 40	24 - 26	7 - 19	(Saini <i>et al.</i> , 2015)
Epis de maïs	42 - 45	35 - 39	14 - 15	(Prasad <i>et al.</i> , 2007)
Paille de blé	33 - 38	26 - 32	17 - 19	(Saini <i>et al.</i> , 2015)
Paille de riz	28 - 36	23 - 28	12 - 14	(Saini <i>et al.</i> , 2015)
Bagasse de canne à sucres	40,2	23,5	25,2	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
<i>Switchgrass</i>	31,0	20,4	17,6	(Menon et Rao, 2012)
<i>Miscanthus</i>	39 - 49	23 - 28	16 - 25	(Kim <i>et al.</i> , 2012)
Déchets solides municipaux	33	9	17	(Saxena <i>et al.</i> , 2009)

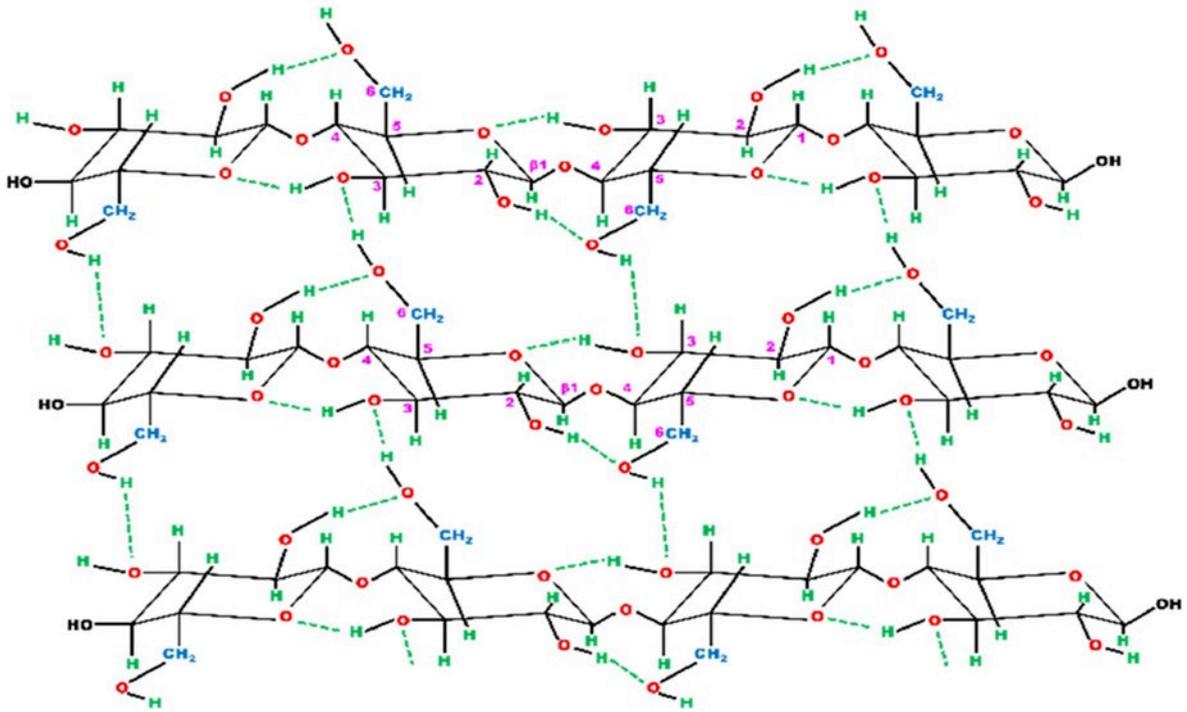
La proportion de ces constituants varie selon le type de BLC, par exemple, les biomasses issues du bois contiennent plus de cellulose et de lignine que les biomasses herbacées, qui quant à elles, présentent une teneur plus élevée en hémicellulose. Par ailleurs, il existe également des différences au sein du même type de biomasse, à titre d'exemple, les teneurs en cellulose et hémicellulose sont plus élevées dans les feuillus que dans les résineux, mais celle de la lignine est plus

importante dans les résineux que les feuillus (Beg *et al.*, 2001 ; Van Dyk and Pletschke, 2012).

### 1.2.1. Cellulose

La cellulose représente le matériau polysaccharidique majoritaire de la paroi des cellules végétales ainsi que la source de carbone organique la plus abondante sur la planète (Nagarajan *et al.*, 2017). La molécule de cellulose est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucopyranoses liées entre elles par des liaisons osidiques  $\beta$ -(1,4). Les chaînes de cellulose sont associées entre elles par des liaisons hydrogène pour s'organiser en microfibrilles, chacune mesurant environ 3 à 6 nm de diamètre et renfermant des milliers de résidus de glucose (Vorwerk *et al.*, 2004 ; Zheng *et al.*, 2009). La longueur des chaînes de cellulose est généralement exprimée sous forme de degré de polymérisation (DP) qui se définit par le nombre moyen d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose (Ibrahim *et al.*, 2010). Le DP des fibres de cellulose peut varier selon sa provenance et son emplacement dans la paroi cellulaire et est compris entre quelques centaines et plusieurs milliers (Himmel, 2009). Dans ce contexte, Pang *et al.* (2018) ont rapporté un DP de 351 pour les fibres de cellulose extraites de la sciure de bois d'*Acacia mangium*, 329 pour celles d'épi du maïs, et un DP allant jusqu'à 564 et 571 pour la cellulose des résidus de sagou et la bagasse de canne à sucre, respectivement. D'après Ibrahim *et al.* (2010), le DP de la fraction cellulosique contenue dans les résidus agricoles est compris entre 167 et 1616.

Les extrémités des chaînes de cellulose présentent deux extrémités chimiquement non équivalentes, l'une réductrice où le carbone anomérique est libre et l'autre non réductrice où le carbone anomérique intervient dans la liaison glucosidique (Poletto *et al.*, 2013). Les liaisons hydrogène intra- et inter-chaînes, induites par les fonctions hydroxyles présentes sur les unités de glucose, confèrent à la cellulose une structure cristalline hautement ordonnée (**Figure I.3**) (Lindman *et al.*, 2010 ; Medronho and Lindman, 2014).



**Figure I.3.** Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans le polymère de cellulose (Nagarajan *et al.*, 2017)

Il existe des zones non cristallines dans les microfibrilles, surtout localisées à la surface de celles-ci, se caractérisant par une densité plus faible et un niveau moins ordonné. Elles sont appelées régions amorphes et sont moins résistantes à la biodégradation que les régions cristallines ordonnées. En plus des liaisons hydrogènes caractéristiques de la cellulose, les interactions hydrophobes et de Van der Waals exercent un rôle important dans la stabilisation de la structure de cellulose (Nagarajan *et al.*, 2017). Les microfibrilles de cellulose sont regroupées en faisceaux plus épais, au sein de la paroi secondaire, et forment ainsi des macrofibrilles. De plus, la cellulose est incorporée dans une matrice d'hémicellulose, de pectines et de lignine (Arantes and Saddler, 2010) ce qui lui confère une structure de plus en plus compacte et rigide, en adéquation avec son rôle de squelette extracellulaire. Le coton représente la source la plus pure de cellulose (80-95%) (Demirbaş, 2005).

En outre, le poids moléculaire élevé ainsi que la structure tertiaire ordonnée rendent la cellulose insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques classiques (Mazeau and Heux, 2003). Bien que les matériaux amylics nécessitent des températures de 60-70°C pour la conversion de la structure rigide en structure

amorphe, la cellulose exige une température de 320°C ainsi qu'une pression de 25 MPa pour effectuer la transition cristalline à amorphe dans l'eau (Deguchi *et al.*, 2006).

Naturellement, la structure cristalline de la cellulose se présente sous la forme I, dite également forme native. Il pourrait être possible d'attribuer d'autres structures cristallines à la cellulose (allomorphes II, III, et IV), artificiellement, en lui faisant subir des traitements physico-chimiques (Nelson and O'Connor, 1964 ; Wada *et al.*, 2010 ; Nagarajan *et al.*, 2017). Ces structures distinctes révèlent de nombreuses différences telles que la nature des arrangements cristallins des chaînes de cellulose (parallèles et antiparallèles), la taille des cristallites, la longueur et la rigidité des liaisons hydrogènes, et la stabilité thermodynamique (Wada *et al.*, 2010). La forme de cellulose obtenue après régénération (solubilisation puis précipitation et recristallisation) est désignée par la cellulose II (Medronho and Lindman, 2014 ; Wahlström and Suurnäkki, 2015).

### 1.2.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, le second biopolymère renouvelable le plus abondant sur Terre (Saha, 2003). L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide ramifié formé d'hexoses ( $\beta$ -D-glucose,  $\beta$ -D-mannose,  $\beta$ -D-galactose) et de pentoses ( $\beta$ -D-xylose,  $\alpha$ -L-arabinose et/ou acide uronique) (Menon and Rao, 2012). On peut également trouver d'autres sucres en faibles proportions tels que l' $\alpha$ -L-rhamnose ou l' $\alpha$ -L-fucose. En général, elles se caractérisent par des chaînes moléculaires plus courtes avec un degré de polymérisation (DP) compris en moyenne entre 80-200. Traditionnellement, les hémicelluloses désignent les polysaccharides solubles dans des solutions alcalines (Scheller and Ulvskov, 2010). Cependant, certains polysaccharides tels que les arabinogalactanes et les arabinanes sont solubles dans l'eau. Selon l'origine pariétale, le type de tissus cellulaires, l'âge des cellules et leur situation au sein de la paroi végétale, la structure et la composition des hémicelluloses varient considérablement (**Tableau I.2**).

**Tableau I.2.** Les principaux types de polysaccharides présents dans les hémicelluloses (Gírio *et al.*, 2010 ; Scheller and Ulvskov, 2010)

Polysaccharides	Origine biologique	Teneur <sup>a</sup>	Chaîne principale (β-1,4)	Chaînes latérales	Ramification	DP <sup>b</sup>
Arabinogalactanes	Résineux	5-35	β-D-Galp	β-D-Galp α-L-Araf β-L-Arap	β-(1-6) α-(1-3) β-(1-3)	100-600
Xyloglucanes	Feuilleux, et herbacées	2-25	β-D-Glcp β-D-Xylp	β-D-Xylp β-D-Galp α-L-Araf α-L-Fucp Acétyle	α-(1-3) β-(1-2) α-(1-2) α-(1-2)	
Galactoglucomannanes	Résineux	10-25	β-D-Manp β-D-Glcp	β-D-Galp Acétyle	α-(1-6)	40-100
Glucomannanes	Résineux, Feuillus	2-5	β-D-Manp β-D-Glcp			
Glucuronoxylanes	Feuillus	15-30	β-D-Xylp	4-O-Me-α-D-GlcpA Acétyle	α-(1-2)	100-200
Arabinoglucuronoxylanes	Herbacées et résineux	5-10	β-D-Xylp	4-O-Me-α-D-GlcpA α-L-Araf	α-(1-2) α-(1-3)	50-185
Arabinoxylanes	Céréales	0,15 - 30	β-D-Xylp	α-L-Araf Feruloyl	α-(1,2) α-(1,3)	
Glucuronoarabinoxylanes	Herbes	15-30	β-D-Xylp	α-L-Araf 4-O-Me-α-D-GlcpA Acétyle	α-(1-2) α-(1-3)	
Homoxylanes	Algues		β-D-Xylp <sup>c</sup>			
β-(1-3, 1-4)-glucanes	Herbes		β-D-Glcp			

a : % Matière sèche

b : Degré de polymérisation

c : Peut également présenter des liaisons β- (1 → 3) sur la chaîne principale

Ainsi, à l'homogénéité de la cellulose, s'opposent l'hétérogénéité et la diversité des hémicelluloses. Ces hétéropolymères comprennent des xylanes, des mannanes,

des galactanes et des arabinanes. Donc, par extension, le terme hémicelluloses désigne tous les polysaccharides présents dans la paroi végétale ne correspondant ni à la cellulose ni à la pectine. Les hémicelluloses sont constituées par un squelette osidique principal, le suffixe –ane désignant la nature de ce squelette. A ce squelette principal se branchent d'autres polysaccharides et/ou des groupements acétyle dont la nature et la proportion dépendent du type de biomasse. A titre d'exemple, les arabinoxylanes sont formés à partir d'une chaîne principale de xylose, substituée par des résidus arabinose.

Ainsi comme le montre le **Tableau I.2**, la composition des hémicelluloses diffère selon le type de BLC. A titre d'exemple, le glucuronoxylane (O-acétyl-4-O-methylglucuronoxylane) constitue l'hémicellulose principale des bois de feuillus (Gírio *et al.*, 2010), tandis que le galactoglucomannane (O-acétyl-galactoglucomannane) représente jusqu'à 20 à 25% de la matière sèche des résineux. Cependant, les bois de feuillus peuvent aussi contenir de faibles quantités de glucomannes ne dépassant pas les 5% de la matière sèche du bois (Gírio *et al.*, 2010).

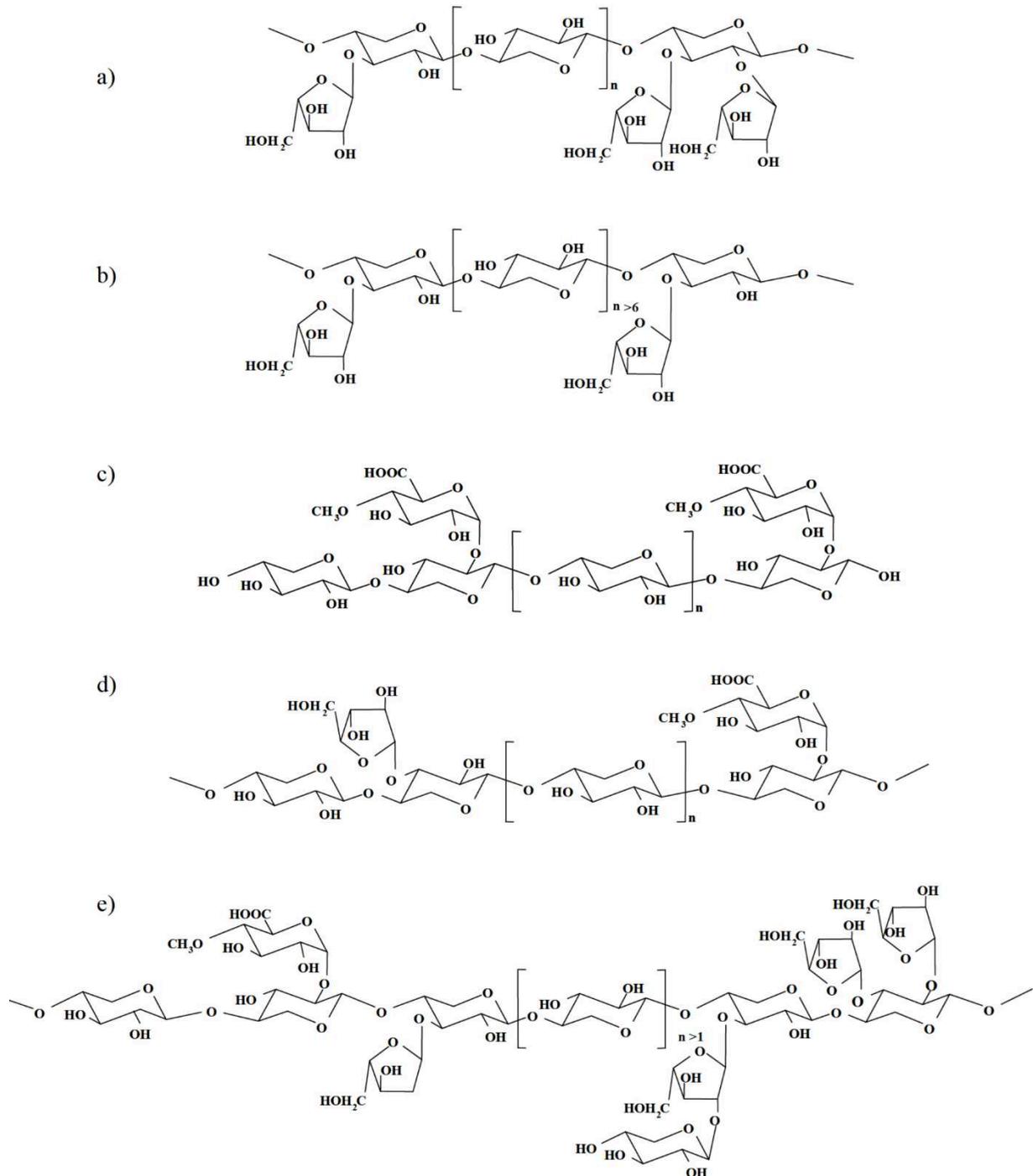
La ramification des chaînes principales des hémicelluloses par des chaînes latérales courtes empêche leur rapprochement et l'arrangement cristallin, c'est pourquoi les hémicelluloses sont considérées des polymères amorphes plus faciles à dégrader que la cellulose (Limayem and Ricke, 2012 ; Haghghi Mood *et al.*, 2013).

Les hémicelluloses sont généralement associées aux autres composants de la paroi cellulaire tels que la cellulose, les protéines de la paroi cellulaire, la lignine et d'autres composés phénoliques par des liaisons covalentes et hydrogènes et par des interactions ioniques et hydrophobes (Sun and Cheng, 2002).

D'une manière générale, les xylanes, représentant le polysaccharide non cellulosique le plus abondant dans la nature, sont les composants majoritaires des hémicelluloses. Ils représentent environ un tiers de la source de carbone organique renouvelable sur Terre (Ebringerová and Heinze, 2000 ; Collins *et al.*, 2005). Les xylanes contiennent principalement des résidus  $\beta$ -D-xylopyranosyl liés par des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques dans la structure de base avec des résidus d'acétate, d'arabinose et de glucose comme substituants, dits plutôt hétéroxylanes. D'une manière générale, la présence d'homoxylanes est rarement possible chez les plantes supérieures. Cependant, des xylanes linéaires neutres ont été isolés dans les téguments des

graines de guar (Umadevi Sajjan and Salimath, 1986). Ces xylanes sont faiblement branchés et renferment peu ou pas d'acides uroniques. Les substitutions du xylose se font sur leur groupement hydroxyle en position 3 et plus rarement sur le groupement hydroxyle en position 2. La composition, la taille et la position de fixation sur la chaîne principale dépendent de l'espèce végétale et de l'origine variétale. Le degré de substitution du xylane ainsi que la nature des substituants déterminent ses propriétés physicochimiques, entre autres, sa solubilité et sa liaison avec la cellulose. De plus, le niveau d'acétylation affecte également la solubilité du xylane dans différents solvants (Gröndahl *et al.*, 2003). Le xylane présentant un degré d'acétylation faible (DA ~ 0,5) est totalement soluble dans l'eau tandis que le xylane hautement acétylé (DA = 2,0) ne se dissout que dans les solvants apolaires tels que le chloroforme ou dans des solvants polaires aprotiques tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO). Quant au xylane non acétylé (DA ~ 0), il n'est que partiellement soluble dans l'eau chaude (Pawar *et al.*, 2013).

Selon le type de substituants, on peut distinguer différents types de xylanes, montrés en **Figure I.4**.



**Figure I.4.** Exemples de structure de différents types de xylanes, a) arabinoxylan fortement substitué, b) arabinoxylan faiblement substitué, c) 4-O-méthylglucuronoxylan, d) arabino-4-O-méthylglucuronoxylan, e) hétéroxylan (D'après Ebringerová and Heinze, 2000)

Les glucuronoxylanes sont des xylanes acides substitués par l'acide glucuronique, qui porte le plus souvent un groupement méthyle et se trouve alors sous

forme d'acide 4-O-méthylglucuronique, caractéristique des angiospermes dicotylédones (Ebringerová and Heinze, 2000). Certains de ces xylanes sont irrégulièrement ramifiés en position O-2 et O-3 du xylose par des groupements acétyle, correspondant aux O-acétyl-4-O-méthylglucuronoxylanes.

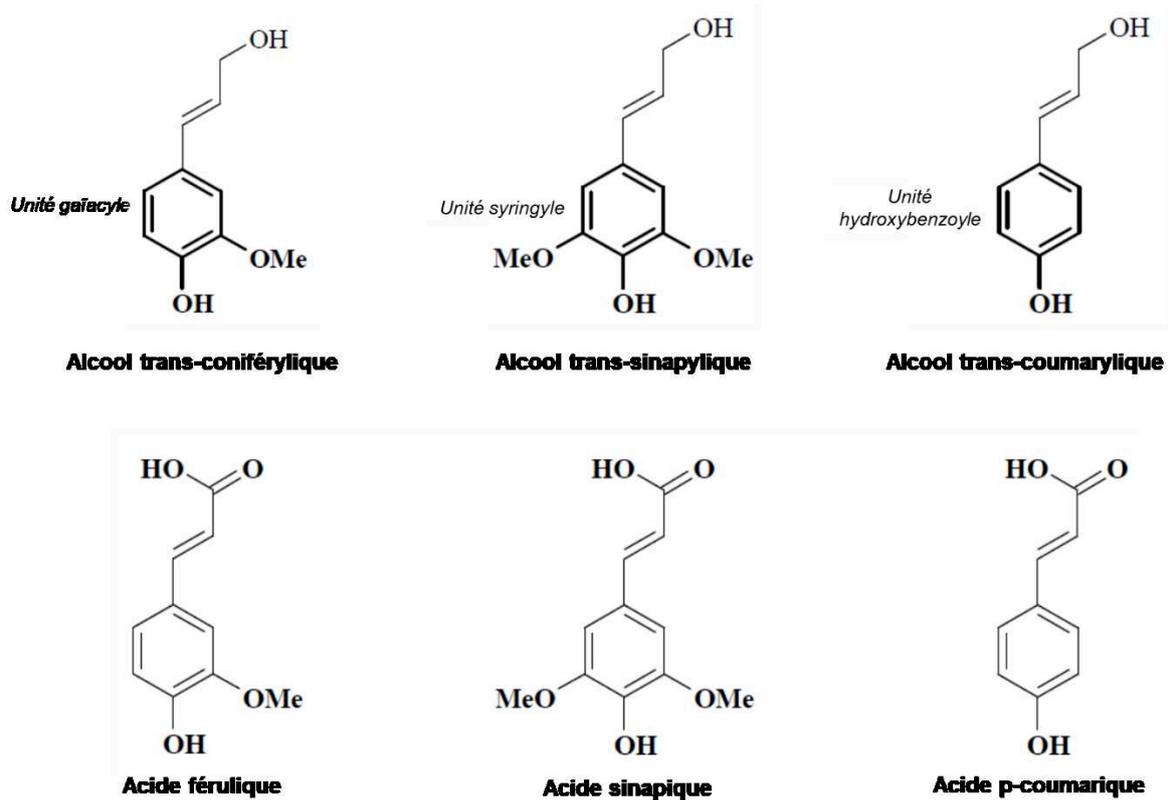
Les arabinoglucuronoxylanes peuvent également se retrouver dans les bois de résineux. Ils sont ramifiés par des monomères de  $\alpha$ -L-arabinose en position O-3 du xylose et par l'acide  $\alpha$ -D-glucuronique et/ou sa forme méthylée lié au xylose en position O-2.

Enfin, les hétéroxylanes sont caractérisés par une diversification des chaînes latérales dont la longueur ne dépasse pas trois résidus et sont composées de résidus de  $\alpha$ -L-arabinose, d'acide  $\alpha$ -D-glucuronique ou parfois de son dérivé méthylé, de D-galactose, D-glucose ou D-xylose. De plus, les unités d'arabinose, au sein des chaînes latérales des hétéroxylanes peuvent être estérifiées par l'acide férulique ou l'acide para-coumarique. Ceci est à l'origine de la diversité structurale des xylanes au sein du règne végétal (Ebringerová and Heinze, 2000 ; Gírio *et al.*, 2010 ; Scheller and Ulvskov, 2010).

### 1.2.3. Lignines

Les lignines représentent le biopolymère aromatique le plus abondant sur Terre et sa production a été estimée à 62 millions de tonnes par an (Wang *et al.*, 2019). Les lignines, synthétisées à la fin du développement cellulaire se retrouvent notamment dans la paroi secondaire des plantes vasculaires.

Les lignines sont des polyphénols définis comme une macromolécule tridimensionnelle amorphe, hydrophobe et de poids moléculaire élevé. Le squelette aromatique et phénolique des lignines résulte de l'assemblage de trois monomères de type phénylpropane : alcools *trans-p*-coumarique (unité H), *trans*-coniférylique (unité G) et *trans*-sinapique (unité S). Ces trois monomères, désignés sous le terme général de monolignols, diffèrent par le nombre de groupements méthoxyl attachés au noyau aromatique : zéro, un ou deux groupements méthoxyl, respectivement (**Figure I.5**) (Azadi *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013 ; Gillet *et al.*, 2017).



**Figure 1.5.** Structures chimiques des trois monolignols constitutifs du squelette des lignines : alcool trans-coniférylique (unité G), alcool trans-sinapylique (unité S) et alcool trans-coumarylique (unité H), et des acides hydroxycinnamiques précurseurs : acide férulique, acide sinapique et acide p-coumarique

Les précurseurs de ces monolignols, les acides hydroxycinnamiques sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique des cellules en voie de développement. Ils dérivent de la phénylalanine après une série de réactions de désamination, d'hydroxylation, de méthylation et de réduction (réduction de la fonction acide carboxylique en fonction alcool) (**Figure 1.5**) (Pandey and Kim, 2011 ; Azadi *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013). Ces monolignols sont ensuite oxydés au niveau de la paroi cellulaire par l'action d'enzymes telles que les laccases et les peroxydases. Ces radicaux sont associés entre eux au hasard et sans intervention enzymatique par des liaisons éther et carbone-carbone dont la proportion varie considérablement selon l'espèce et le type de BLC. Toutefois, il est considéré que les liaisons de type éther constituent plus des deux tiers de la totalité des liaisons chimiques au sein des lignines (Azadi *et al.*, 2013). Cela est à l'origine de la grande variabilité dans la structure des lignines et justifie l'emploi des lignines au pluriel.

La teneur en lignines et le ratio entre les différents monomères varient en fonction de l'espèce végétale mais aussi au sein d'une même espèce selon le type cellulaire, l'âge de la cellule et sa localisation. En effet, la teneur en lignines des différentes BLC décroît comme suit : bois des résineux (27 – 33%) > bois des feuillus (18 – 25%) > biomasses herbacées (17 – 24%) (Azadi *et al.*, 2013). Les lignines des résineux comprennent principalement de l'alcool coniférylique alors que celles des feuillus sont à la fois formées à partir d'alcools coniférylique et sinapique avec des traces d'alcool coumarique (Li *et al.*, 2015). Enfin, la lignine constitutive des biomasses herbacées renferme les trois monomères en diverses proportions. Quant aux liaisons interpolymères, la lignine est liée aux polysaccharides par des liaisons covalentes et hydrogènes, et plus particulièrement par des liaisons ester qui s'établissent avec les hémicelluloses. Il est donc considéré que la lignine remplit l'espace entre la cellulose et l'hémicellulose au sein des parois cellulaires et agit comme une résine conférant la rigidité et la structure compacte à la matrice lignocellulosique (Lupoi *et al.*, 2015 ; Gillet *et al.*, 2017).

De manière générale, la structure des lignines reste actuellement méconnue et il est difficile d'y attribuer une structure exacte et généralisée. Selon la méthode d'extraction, les lignines isolées (lignines d'extraction) sont différentes des lignines dans leur forme native (*in situ*). On parlera ainsi de lignines Kraft, lignosulfates, klason, ou organosolv (Zakzeski *et al.*, 2010).

#### 1.2.4. Autres constituants

La BLC renferme également des lipides, des protéines ainsi que des extraits et des minéraux en quantités moindres. Les protéines (2 - 10% de la matière sèche de la paroi) sont dotées de fonctions structurales et sont aussi impliquées dans la morphogénèse, les interactions cellulaires et les mécanismes de défense contre les pathogènes (Keegstra *et al.*, 1973 ; Wagner and Kohorn, 2001 ; Caffall and Mohnen, 2009). Les autres sont des enzymes telles que des glycosidases, des glycosides transférases ou des peroxydases (Lagaert *et al.*, 2009).

De manière générale, les extraits renfermant à la fois des composés hydrophiles et lipophiles, représentent entre 1 et 8% de la BLC. Les composés aromatiques et phénoliques comme les tannins et les flavonoïdes correspondent aux substances hydrosolubles, extractibles par l'eau ou par des solvants organiques polaires. Les

composés gras, cireux et les terpènes représentent les substances extractibles par les solvants apolaires (Taherzadeh and Karimi, 2007 ; Kumar *et al.*, 2008).

### **1.3. Valorisation des principaux constituants de la BLC**

Les études initiales de valorisation de la BLC se sont intéressées à la conversion de la cellulose uniquement en monomères de glucose en vue de la production de bioéthanol de deuxième génération (2G) ou de biogaz (méthane et dihydrogène). Or, actuellement, l'intérêt se concentre de plus en plus sur la co-valorisation des autres constituants principaux de la BLC, à savoir les hémicelluloses et les lignines afin d'augmenter la rentabilité du procédé et le rendre économiquement viable à l'échelle industrielle, obéissant ainsi au concept de la bioraffinerie dont le principe global est de valoriser la plante dans son intégralité (Ohara, 2003 ; FitzPatrick *et al.*, 2010).

#### **1.3.1. Cellulose : Valorisation en Bioéthanol deuxième génération**

##### **1.3.1.1. Présentation générale**

L'utilisation de l'éthanol pur ou mélangé à l'essence dans le secteur du transport date de longtemps et remonte à l'origine de l'industrie des automobiles. Par exemple, le premier moteur à combustion interne, développé par Samuel Morey en 1826 fonctionna avec un mélange d'éthanol et de térébenthine. Puis, en 1876, l'éthanol fut employé dans le moteur à explosion, inventé par Nicholas Otto (Solomon *et al.*, 2007). En outre, Henry Ford et d'autres avaient produit plusieurs modèles de moteurs et prototypes d'automobiles pouvant fonctionner à l'éthanol. Ce n'est qu'en 1908 que Henry Ford mit au point son modèle T en tant que véhicule à carburants mixtes (FFV : Flexible Fuel Vehicle) dont le moteur fut spécialement adapté à l'éthanol, à l'essence ou au mélange des deux (Rosillo-Calle and Walter, 2006 ; Solomon *et al.*, 2007). Au milieu des années 1920, l'éthanol fut largement mélangé au carburant fossile dans la plupart des pays industrialisés à l'exception des Etats-Unis où l'essence issue du pétrole était disponible à très bon marché. Durant cette période, des carburants mixtes d'alcools et d'essence étaient commercialisés sous des noms commerciaux tels que Alcolene, Agrol ou Vegaline (Freudenberger, 2009). Ensuite, entre la période survenant après la seconde guerre mondiale et les années 1970, l'éthanol fut remplacé par le carburant fossile bon prix qui est devenu le carburant de choix dans la plupart des pays à l'époque (Rosillo-Calle and Walter, 2006). Suite aux chocs pétroliers survenant entre 1973 et 1979, la communauté internationale s'est rendue compte de

sa dépendance vis-à-vis du pétrole et a accordé plus d'attention à l'éthanol en tant que substituant ou additif aux carburants issus du pétrole (Hansen, 2005). Dans ce contexte, la directive européenne existante 2009/28/CE sur les sources d'énergies renouvelables, adoptée en 2009 a fixé comme objectif qu'une part de 20% de la consommation énergétique provienne de sources renouvelables à l'échéance de 2020. De plus, celle-ci a défini un objectif contraignant pour chaque Etat membre qu'au moins 10% de sa consommation finale d'énergie pour le secteur de transport soit à base d'énergies renouvelables.

L'éthanol mélangé à l'essence peut être utilisé sans aucune adaptation du moteur jusqu'à une teneur de 10% (v/v) ou encore jusqu'à 22% (v/v) si l'éthanol est transformé en éthyl tertio butyl éther avant son incorporation. Néanmoins, l'utilisation de l'éthanol sous forme pure ou à teneur élevée (85% dans le superéthanol par exemple) requiert des moteurs spécialement adaptés. Le Brésil a été décrit comme le seul pays à avoir utilisé l'éthanol sous forme pure et mélangé à l'essence (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006 ; Rosillo-Calle and Walter, 2006).

Le bioéthanol est le plus utilisé à l'échelle mondiale pour l'alimentation des moteurs des véhicules en comparaison avec les autres biocarburants tels que le biométhane, le biodiesel ou le biohydrogène (Balat, 2011).

#### *1.3.1.2. Bioéthanol de deuxième génération*

Le bioéthanol peut être produit à partir de différents types de végétaux. Les plantes sucrières telles que les betteraves et la canne à sucre, ou amylacées telles que le blé et le maïs, pour ne citer que quelques exemples, peuvent servir de matières premières pour la production de bioéthanol dit de première génération (FitzPatrick *et al.*, 2010). L'exploitation des cultures sucrières et amylacées présente cependant certains inconvénients. Ces cultures sont traditionnellement destinées à l'alimentation humaine ou animale (Galbe and Zacchi, 2002). La production de biocarburants à partir de ces ressources entre donc directement en concurrence avec la production alimentaire, ce qui a pour conséquences, d'une part, la hausse des prix des aliments et d'autre part, le risque du développement d'une agriculture intensive qui pourrait causer des dégâts considérables sur l'environnement (pollution des eaux, déforestation, etc.) (Pimentel, 2003). De plus, le procédé de production de bioéthanol

de première génération n'est pas viable étant donné qu'il n'y a pas assez de surfaces cultivables (Sims *et al.*, 2010).

Toutes ces considérations ont mené à l'exploitation des substrats lignocellulosiques et à la transition vers les biocarburants avancés dits de deuxième (obtenus de la BLC) et troisième génération (dérivés de microalgues). La production de bioéthanol de troisième génération est encore à un stade immature et limitée à l'échelle du laboratoire tandis que le bioéthanol de première et deuxième est produit à l'échelle commerciale (Zabed *et al.*, 2016). La BLC se trouve dans toutes les plantes, y compris dans les parties non comestibles telles que les tiges ou les coques de graines par exemple (Kumar *et al.*, 2008). Compte tenu du fait qu'elle est constituée en grande partie de polysaccharides, qu'elle représente la matière première la plus renouvelable sur terre, et qu'elle n'entre pas directement en compétition avec l'alimentation humaine, l'exploitation de la BLC pour la production de bioéthanol de deuxième génération (2G) présente un intérêt grandissant (Phitsuwan *et al.*, 2013).

Néanmoins, le développement de bioéthanol 2G à partir de la BLC tels que des résidus forestiers et/ou et des cultures herbacées est confronté à plusieurs obstacles. Le sucre ne se trouve pas sous forme libre dans la biomasse mais sous forme de cellulose et d'hémicellulose qui doivent être hydrolysées pour libérer le glucose et les autres sucres fermentescibles qui les constituent. De plus, la structure complexe de la lignocellulose lui confère une grande résistance à la dépolymérisation (Phitsuwan *et al.*, 2013), entravant ainsi l'hydrolyse des polysaccharides et faisant du prétraitement de la BLC une étape cruciale et inévitable du procédé. Il est important d'indiquer que la fermentation efficace des hydrolysats de la BLC contenant à la fois des hexoses et des pentoses est également un point à considérer. Par conséquent, la production de bioéthanol à partir de la BLC peut se diviser en quatre étapes principales incluant le prétraitement, l'hydrolyse de la cellulose et l'hémicellulose en monomères, la fermentation microbienne des sucres en bioéthanol et enfin la récupération du produit par distillation et purification.

#### *1.3.1.3. Avantages du Bioéthanol de deuxième génération*

Le bioéthanol, de formule chimique  $C_2H_5OH$  est qualifié de carburant oxygéné avec 34,7% d'oxygène, en comparaison à l'essence ( $C_7H_{17}$ ) où l'oxygène est absent (Kar and Deveci, 2006). Un litre d'éthanol produit environ 66% de l'énergie fournie par

un litre d'essence. Cependant, de par son indice d'octane plus fort (106 – 110) que celui de l'essence (91 – 96), l'éthanol mélangé avec de l'essence peut améliorer ses performances (Nigam and Singh, 2011). En effet, l'indice d'octane plus fort de l'éthanol permet de diminuer les problèmes de combustion en l'accélération et en augmentant le taux de compression du moteur ce qui réduit ainsi les cognements de celui-ci. La présence d'oxygène dans l'éthanol permet d'améliorer l'efficacité de sa combustion de 15% par rapport à celle de l'essence (Kar and Deveci, 2006) et ainsi de réduire l'émission de monoxyde de carbone, d'hydrocarbures non brûlés intervenant dans la formation d'ozone et des particules émises qui sont à la base de nombreux troubles respiratoires et causent le noircissement des bâtiments (Zabed *et al.*, 2017). En outre, comparé aux carburants fossiles, l'éthanol contient des quantités négligeables de soufre et ainsi le mélange de ces deux carburants permet de diminuer la teneur en soufre. Par conséquent, la combustion de l'éthanol ne produit qu'une infime quantité d'oxyde de soufre qui est carcinogène et contribue aux pluies acides (Zabed *et al.*, 2017). De plus, le bioéthanol peut également remplacer le méthyl tertio butyl éther (MTBE) qui est souvent utilisé comme agent exhausteur d'indice d'octane de l'essence. Il a été rapporté que le MBTE peut être entraîné jusqu'aux nappes souterraines contaminant ainsi l'eau potable et causant des effets sévères sur la santé (Green and Lowenbach, 2001). Par ailleurs, la combustion des énergies fossiles génère du nouveau dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'atmosphère ce qui aggrave l'effet de serre et épuise une ressource non renouvelable. Cependant, la combustion de la nouvelle biomasse créée par photosynthèse ne produit pas de nouveau CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, car la replantation de la biomasse récoltée garantit que le CO<sub>2</sub> soit absorbé et retourné pour un cycle de nouvelle croissance (McKendry, 2002). Toutefois, il est à préciser que la teneur en eau de l'éthanol est un facteur clé à contrôler lors de son utilisation en tant que carburant. L'éthanol hydraté (contenant environ 2 à 7% d'eau) est utilisé dans les moteurs adaptés à l'éthanol sous forme pure. Cependant, l'éthanol mélangé à l'essence doit être anhydre (avec une teneur en eau ne dépassant pas 0,7%) car sinon il peut se produire des problèmes de séparation de phase dans le mélange essence – éthanol (Rosillo-Calle and Walter, 2006).

La production de bioéthanol à partir de la BLC met en avant plusieurs contributions positives de ce carburant sur la qualité de l'air en réduisant les gaz à effet de serre, sur la gestion des déchets en les valorisant et la diversification de

l'approvisionnement énergétique sans concurrence avec l'alimentation et sans que les sols soient affectés (Sims *et al.*, 2010). Même si les coûts de production de bioéthanol de deuxième génération sont jusqu'à présent considérés élevés, les procédés de production sont encore améliorables. De plus, la valorisation des autres constituants principaux de la BLC permettra de réduire les coûts et rendre le processus de production de bioéthanol à partir de la BLC viable d'un point de vue économique (FitzPatrick *et al.*, 2010 ; Gírio *et al.*, 2010).

#### *1.3.1.4. Autres molécules à haute valeur ajoutée à partir de la cellulose*

Bien que la conversion du glucose cellulosique en bioéthanol 2G par les microorganismes de fermentation éthanolique constitue la voie principale et très fréquemment étudiée, cela n'empêche pas l'existence d'autres voies de valorisation possibles. Dans ce travail de thèse, on s'intéresse à la valorisation du glucose issu de l'hydrolyse enzymatique de la fraction cellulosique en bioéthanol à travers la voie fermentaire des levures. Cependant, en faisant varier le microorganisme (bactérie ou levure) employé et sous des conditions déterminées, la fermentation du glucose cellulosique pourrait être à l'origine d'autres biocarburants dont le biobutanol, le dihydrogène, l'acétone, et divers acides, entre autres, l'acide lactique, succinique, propionique, fumarique et  $\alpha$ -cétoglutarique (Wasewar *et al.*, 2004 ; Ntaikou *et al.*, 2008 ; Qureshi *et al.*, 2010 ; Litsanov *et al.*, 2012 ; Ryu *et al.*, 2015). La polymérisation de molécules d'acide lactique permet la synthèse d'acide polylactique, l'un des matériaux thermoplastiques biodégradables qui ont connu un développement industriel remarquable (Jamshidian *et al.*, 2010). Dans ce contexte, il a été démontré que l'addition des fibres de cellulose aux acides polylactiques a permis le renforcement de ces composites, ce qui représente également une application intéressante du polymère de cellulose (Oksman *et al.*, 2003 ; Iwatake *et al.*, 2008). Par ailleurs, les acides cités ci-dessus constituent des molécules à haute valeur ajoutée qui trouveront des applications intéressantes variées, comme par exemple l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique qui est utilisé pour la synthèse de compléments alimentaires, de produits pharmaceutiques et cosmétiques et de composés hétérocycliques (Chin *et al.*, 2014 ; Ryu *et al.*, 2015).

### 1.3.2. Hémicelluloses

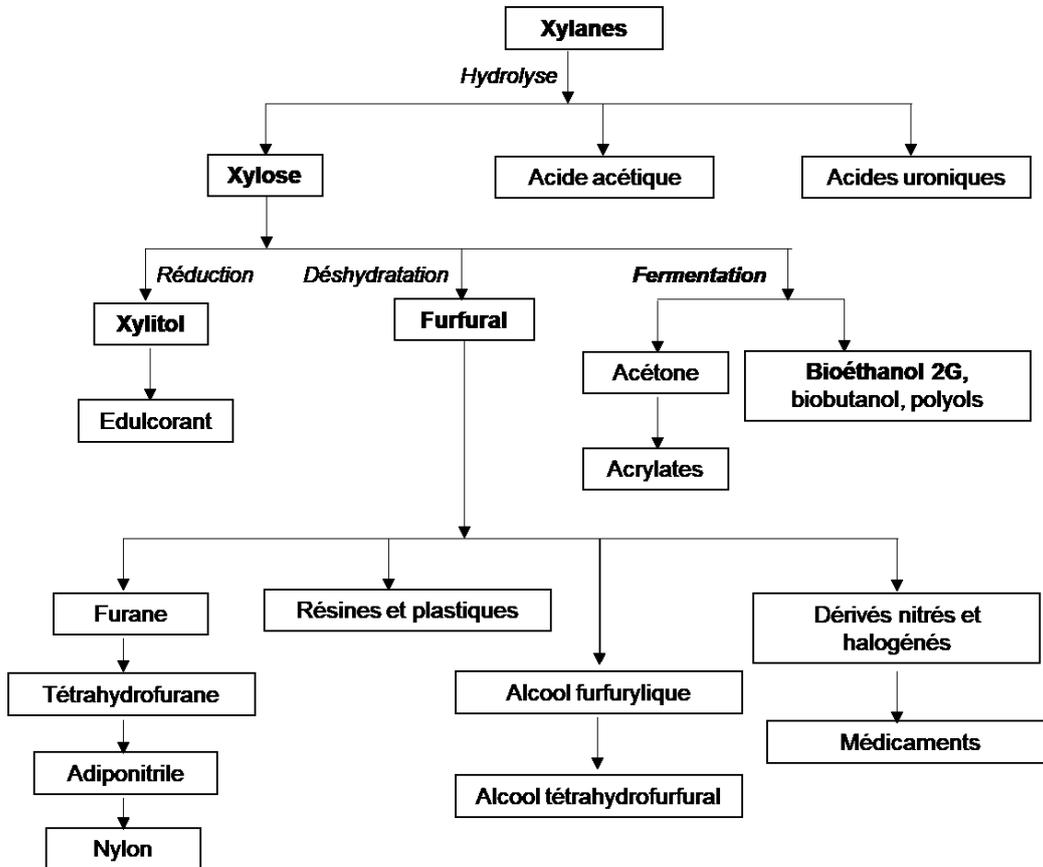
Les hémicelluloses, en général et les xylanes en particulier, possèdent une large variété d'applications et suscitent une attention grandissante même si, à l'heure actuelle ils ne sont pas largement exploités. D'abord, les monomères issus de l'hydrolyse de ces polysaccharides formés de divers sucres à 5 et à 6 atomes de carbones, peuvent être convertis en bioéthanol 2G ou d'autres produits à forte valeur ajoutée exploités dans plusieurs domaines aussi variés que la nutrition, la cosmétologie, la médecine, l'industrie chimique ou encore les matériaux polymères (Canilha *et al.*, 2003). En outre, les hémicelluloses ont également été étudiées pour leurs utilisations médicales possibles en raison de leurs propriétés protectrices (Cipriani *et al.*, 2006) contre l'ulcère, antitussives (Kardošová *et al.*, 2002), immunostimulatrices (Kulicke *et al.*, 1997) et antitumorales (Kitamura *et al.*, 1994).

Les xylanes, de par leur propriétés physico-chimiques originales proches des hydrocolloïdes sont utilisés en tant qu'épaississant, émulsifiant ou gélifiant dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique. De plus, les xylanes sont également utilisés en tant qu'additifs dans la préparation des pâtes à papier, ceci grâce à leurs propriétés liantes qui renforcent la résistance mécanique du papier (El-Ashmawy *et al.*, 1976). Comme les xylanes ne sont pas dégradés par les enzymes digestives humaines, ils sont employés comme des fibres alimentaires dont l'ingestion accélère le transit intestinal.

Bien que les xylanes peuvent être utilisés à l'état natif polymérique, leur valorisation peut également résider dans leur hydrolyse afin de libérer des sucres élémentaires qui trouveront après fermentation, déshydratation ou réduction des applications potentielles variées.

Par exemple, le xylose, obtenu à partir de l'hydrolyse des xylanes, peut être converti en xylitol par hydrogénation catalytique (conversion de la fonction aldéhyde – CHO terminale en fonction alcool primaire –CH<sub>2</sub>OH), connu pour présenter des propriétés sucrantes similaires au saccharose avec un apport calorique inférieur et pour prévenir le développement des caries dentaires. Ces sucres en C5 peuvent également être convertis en furfural, composé organique utilisé comme intermédiaire de synthèse pour la production de solvants ; dans la fabrication de résines ou de certains arômes alimentaires (Binder and Raines, 2010).

Dans la **Figure I.6**, sont résumées les différentes applications des sucres issus de l'hydrolyse des xylanes.



**Figure I.6.** Exemples d'applications industrielles des monomères issus de l'hydrolyse des xylanes (d'après Popa, 1996).

Les différentes procédures possibles de valorisation des xylanes représentées d'une façon globale dans la **Figure I.6** pourraient être attractives d'un point de vue économique particulièrement dans le cas des bois de feuillus qui sont riches en xylanes.

Un autre moyen de valorisation des xylanes repose d'ailleurs sur leur fonctionnalisation qui reste jusqu'à l'heure actuelle très peu étudiée. Citons à titre d'exemple, les xylanes polysulfates (pentosanes polysulfates) qui reconnaissent un développement remarquable dans le domaine de la médecine. En effet, ces dérivés ont été décrits pour leur activité anticoagulante et antitumorale (Ebringerová and Hromádková, 1999 ; Pawar *et al.*, 2008).

Ces voies de valorisation ne sont que des exemples parmi la multitude d'applications que possèdent les hémicelluloses et plus particulièrement les xylanes et qui en font un sujet de recherche de grand intérêt.

Dans ce travail de thèse, on s'intéresse particulièrement à la valorisation de la fraction polysaccharidique de la BLC. Cette valorisation repose sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et de l'hémicellulose en sucres fermentescibles en vue de production de bioéthanol 2G.

### 1.3.3. Lignines

D'une manière générale, les lignines restent actuellement sous-valorisées puisqu'elles sont utilisées principalement comme combustibles ou additifs. Des exploitations émergentes ont été envisagées comme nouvelles voies de valorisation de la lignine aussi bien à l'état polymérique qu'oligomérique ou encore monomérique après dépolymérisation de la lignine. Les lignines sont considérées comme potentiellement aptes à remplacer des polymères synthétiques tels que le polyacrylonitrile (PAN) dans la production de fibres de carbone (Zakzeski *et al.*, 2010 ; Norberg *et al.*, 2013). Elles trouvent également d'autres applications en tant qu'émulsifiants, biodispersants, adhésifs, liants. Par ailleurs, les lignines peuvent être employées pour la fabrication des mousses de polyuréthane connues pour leur qualité d'isolation thermique et peuvent également représenter le composant principal des matériaux thermoplastiques (Holladay *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2015).

Elles peuvent être dépolymérisées, à titre d'exemple, en vanilline et en syringaldéhyde (Araújo *et al.*, 2010 ; Pandey and Kim, 2011) et d'autres composés aromatiques qui peuvent être fonctionnalisés pour la production des molécules plateformes à haute valeur ajoutée dans une multitude de domaines. Citons à titre d'exemple, le benzène, le phénol, le catéchol, le crésol, l'eugénol, le syringol, le coniférol et le gaïacol (Gillet *et al.*, 2017 ; Ponnusamy *et al.*, 2019). De plus, sous différentes conditions, l'oxydation des lignines génère de l'acide vanillique, des acides aliphatiques et aromatiques, des aldéhydes aromatiques, des quinones et des cyclohexanols (Ponnusamy *et al.*, 2019).

La gazéification des lignines génère ce qu'on appelle du gaz de synthèse (ou syngas) comme le monoxyde de carbone et l'hydrogène. L'hydrogène représente une source d'énergie pour l'alimentation des moteurs à hydrogène. De plus, les gaz de

synthèse dérivés de la lignine peuvent être transformés en biocarburants tels que le méthanol, le diméthyle éther ou l'éthanol (Ponnusamy *et al.*, 2019).

## **2. Hydrolyse *in vitro* de la cellulose et des hémicelluloses**

Pour pouvoir être fermentés en éthanol, les polysaccharides de la BLC doivent être hydrolysés en monomères. La dégradation *in vitro* des polymères de cellulose et de l'hémicellulose en monomères de sucre est réalisée selon deux types de procédés, à savoir l'hydrolyse chimique ou enzymatique.

### **2.1. Hydrolyse chimique**

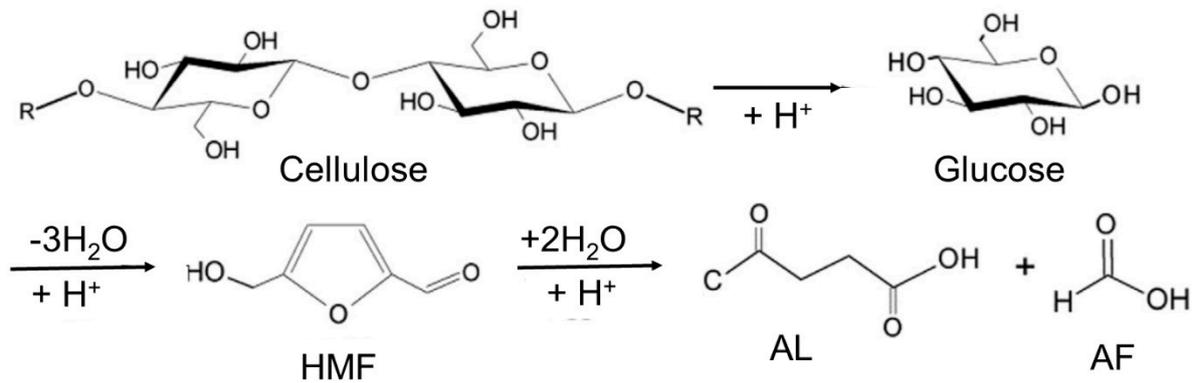
L'hydrolyse chimique implique généralement l'utilisation d'acides inorganiques forts, dilués ou concentrés. L'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) est le plus utilisé dans le processus d'hydrolyse acide de la BLC. D'autres acides inorganiques tels que l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide nitrique ( $HNO_3$ ), l'acide trifluoroacétique (TFA), et l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ) ont également été rapportés pour leur utilisation à cette fin (Gírio *et al.*, 2010). L'approche employant des acides faibles est réalisée à de très hautes températures avec un temps de réaction court, allant de quelques secondes à plusieurs minutes. Cependant, l'utilisation d'acides concentrés est conduite à des températures et pressions moins élevées pendant un temps relativement plus long (Chandel *et al.*, 2007 ; Balat, 2011).

L'hydrolyse par acide dilué (HCl,  $H_2SO_4$  ou  $HNO_3$ ) est généralement destinée à l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique de la BLC et est considérée comme une approche de prétraitement de la cellulose pour la rendre plus accessible aux enzymes (Silverstein *et al.*, 2007). Toutefois, ces deux polysaccharides peuvent être hydrolysés par l'emploi d'acides dilués selon un processus en deux étapes. La première étape, conduite à des températures relativement moins élevées comprises en 50 et 190°C (0,7%  $H_2SO_4$ , 3 – 5 min), permet d'hydrolyser majoritairement la fraction hémicellulosique de la BLC. Suite à cette étape, les rendements d'hydrolyse des fractions hémicellulosique et cellulosique sont estimés à 80% et 29%, respectivement (Chandel *et al.*, 2007). Cette différence de rendements d'hydrolyse entre l'hémicellulose et la cellulose est due aux différences structurales entre ces deux polysaccharides (Zabed *et al.*, 2016). Durant la deuxième étape, la température est élevée jusqu'à 230 ou 240°C (0,4%  $H_2SO_4$ , 3 min), visant ainsi la dépolymérisation de

la cellulose en glucose. Il est ainsi estimé que le rendement maximum en glucose qui pourrait être obtenu ne dépasse pas les 50% du rendement théorique (Hamelinck *et al.*, 2005).

En revanche, l'utilisation d'acides concentrés peut être appliquée pour la dépolymérisation des fractions hémicellulosiques et cellulosiques à la fois. Durant ce procédé, différentes concentrations d'acide sont employées selon la nature de celui-ci : 70 - 90% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 41% de HCl et 100% de TFA (Hayes, 2009). Le temps de réaction de ce procédé, comparé à l'hydrolyse par acide dilué, est relativement plus long, de l'ordre de quelques heures (7 – 12 h). Néanmoins, l'utilisation d'acide concentré conduit à une conversion rapide et complète proche de 90%, de l'hémicellulose et la cellulose en sucres fermentescibles sans nécessiter de prétraitement (Chandel *et al.*, 2007 ; Balat, 2011). L'emploi de grande quantité d'acides est un facteur économique critique et limitant mais qui pourrait être contourné par la récupération de la majorité de l'acide utilisé par échange d'ions en continu (jusqu'à 97%). Toutefois, ce procédé requiert des équipements adaptés, résistants à la corrosion et relativement chers, rendant le procédé onéreux et donc peu attractif du point de vue économique (Hamelinck *et al.*, 2005).

D'une manière générale, l'hydrolyse acide nécessite des températures élevées et une rectification du pH, ce qui est défavorable d'un point de vue énergétique. De plus, la dégradation du glucose en hydroxyméthyl-furfural (HMF), mais également en d'autres composés toxiques tels que l'acide lévulinique, est inévitable dans ces conditions (**Figure I.7**) (Binder and Raines, 2010).



**Figure I.7.** Mécanisme de l'hydrolyse acide de cellulose en glucose. L'hydroxyméthylfurfural (HMF) formé après déshydratation du glucose peut être ensuite dégradé en acide lévulinique (AL) et acide formique (AF) (d'après Xiang *et al.*, 2003 et Kupiainen *et al.*, 2014)

Similairement, le xylose ainsi que les autres pentoses éventuellement présents dans les hydrolysats de la BLC sont dégradés partiellement en furfural et autres produits secondaires indésirables comme par exemple l'acide formique. Ces composés ont en effet été rapportés en tant qu'inhibiteurs de la fermentation microbienne (Klinke *et al.*, 2004). Générés en concentration élevée, l'élimination de ces sous-produits est nécessaire puisqu'ils sont considérés comme inhibiteurs de fermentation.

## 2.2. Hydrolyse enzymatique

Les différentes considérations décrites ci-dessus ont ainsi mené au développement de nouvelles stratégies d'hydrolyse de la BLC mettant en œuvre des enzymes. Les voies biochimiques permettent la conversion de la cellulose et de l'hémicellulose en hexoses et pentoses sélectivement, dans des conditions douces de température et de pH. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique réduit la formation de coproduits tels que l'hydroxyméthylfurfural et le furfural issus de la dégradation des hexoses et des pentoses, respectivement (Wyman *et al.*, 2005 ; Dadi *et al.*, 2006 ; Wahlström and Suurnäkki, 2015).

### 2.2.1. Hydrolyse enzymatique de la cellulose (Saccharification)

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose, catalysée par les cellulases, est considérée comme une approche prometteuse et efficace pour la conversion de

cellulose en glucose en raison de la spécificité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat. Toutefois, les rendements d'hydrolyse sont inférieurs à ceux obtenus par hydrolyse acide, ceci est dû au fait que la cellulose cristalline est peu accessible par les enzymes au sein de la matrice lignocellulosique nécessitant ainsi le développement de prétraitements préalables de la (ligno)cellulose permettant d'accroître la digestibilité de la cellulose (Hendriks and Zeeman, 2009 ; Saini *et al.*, 2015 ; Spyridon *et al.*, 2016). Malgré cette contrainte, cette voie est généralement favorisée et suivie actuellement pour la saccharification de la cellulose.

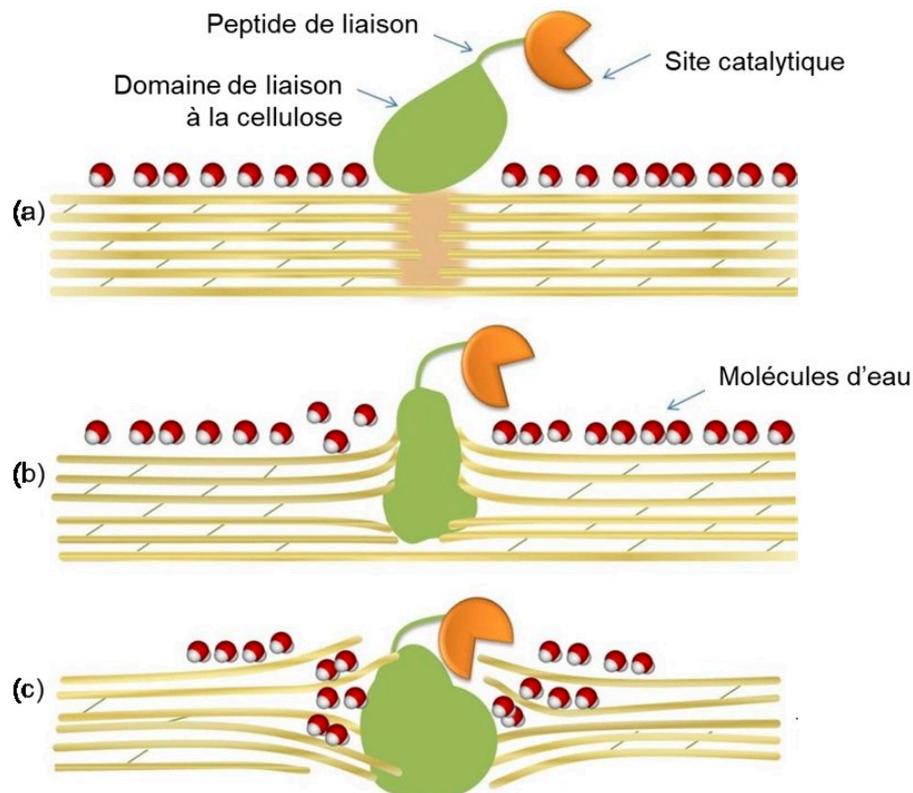
### *2.2.1.1. Les glycosides hydrolases*

Les cellulases sont des glycosides hydrolases (GH) impliquées dans l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4 au sein de la cellulose. Ces enzymes consistent, en général, en un domaine catalytique responsable de la réaction d'hydrolyse et d'un domaine de liaison au substrat, CBD (Cellulose Binding Domain). Les deux domaines sont reliés par des liaisons covalentes par l'intermédiaire d'un peptide de liaison notamment riche en proline, sérine et thréonine. Ce peptide de liaison doit être suffisamment flexible pour permettre une orientation et un fonctionnement efficaces des deux domaines (Rabinovich *et al.*, 2002 ; Levine *et al.*, 2010).

Trois types de cellulases, agissant en synergie, sont impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose :

- Les endoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4), capables d'initier l'hydrolyse et de couper aléatoirement les chaînes de cellulose, majoritairement au niveau des régions amorphes, générant ainsi de nouvelles extrémités réductrices et réduisant rapidement le DP de la cellulose. Elles appartiennent à plusieurs familles de glycosides hydrolases notamment GH5, GH7, GH12 et GH45. Celles-ci se caractérisent par un domaine catalytique ouvert en forme de « crevasse » leur permettant d'attaquer les chaînes internes de la cellulose.
- Les exoglucanases, ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), agissent sur les régions amorphes mais également cristallines de la cellulose (Lynd *et al.*, 2002). Les cellobiohydrolases (CBH) permettent l'hydrolyse processive des extrémités libres des fragments de cellulose produits par les endoglucanases, libérant du cellobiose (deux unités de glucose liées par une liaison glucosidique  $\beta$ -1,4) soit à partir des extrémités réductrices (CBH I, GH7), soit à partir des extrémités non

réductrices (CBH II, GH6). Les CBH présentent une structure du site actif en forme de « tunnel » leur permettant de se déplacer tout au long des chaînes de cellulose, une fois le produit libéré, au site de clivage suivant. Les CBH, notamment les CBH I, tout comme d'autres protéines telles que les expansines sont supposées capables de perturber les microfibrilles de cellulose insoluble par rupture de liaisons hydrogène. Le site catalytique est responsable de l'hydrolyse de la cellulose alors que le domaine de liaison à la cellulose permet l'adsorption des enzymes notamment sur les régions hydrophobes de la cellulose cristalline (Henrissat *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2009 ; Nimlos *et al.*, 2012). Il a été démontré que le CBD induit une perturbation non hydrolytique de la structure cristalline de la cellulose en affectant ses liaisons hydrogène (Levy and Shoseyov, 2002 ; Pinto *et al.*, 2004 ; Arantes and Saddler, 2010). Ceci permet de réduire le degré de cristallinité de la cellulose et améliore considérablement l'activité du site catalytique des cellulases (Hall *et al.*, 2011 ; Mello and Polikarpov, 2014). Un modèle du mécanisme selon lequel les CBH sont capables d'agir sur les régions cristallines de la cellulose insoluble est montré en **Figure I.8** (Klyosov, 1990 ; Arantes and Saddler, 2010).



**Figure I.8.** Représentation schématique de la dispersion des fibres de cellulose induite par le domaine de liaison à la cellulose (adapté de Arantes and saddler, 2010)

Il est proposé que les cellulases s'adsorbent sur les zones cristallines de la cellulose via leur CBD (**Figure I.8 a**). Ensuite, les cellulases s'intercalent dans l'espace interfibrillaire par l'intermédiaire de leur CBD. Les cellulases pénètrent alors entre les fibres de cellulose, ce qui induit ainsi une perturbation de la structure cristalline (**Figure I.8 b**). Cette pression mécanique exercée sur les fibres de cellulose permet aux molécules d'eau de pénétrer de plus en plus dans l'espace capillaire entre les microfibrilles (**Figure I.8 c**). Les molécules d'eau provoquent une perturbation des liaisons hydrogène causant ainsi une dissociation des microfibrilles individuelles. Les CBD, une fois adsorbées sur la surface de cellulose favorisent l'action hydrolytique du site catalytique des cellulases et empêchent la réassociation des chaînes solvatées (Klyosov, 1990).

- Les  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) ou  $\beta$ -glucoside glucohydrolases hydrolysent le cellobiose libéré en glucose, produit final de la réaction enzymatique de la cellulose (Henrissat *et al.*, 1998 ; Lynd *et al.*, 2002). Les  $\beta$ -glucosidases (GH1 et GH3), caractérisées par un domaine catalytique en forme de poche agissent sur les extrémités non réductrices pour libérer une seule unité de sucre. Il s'agit des enzymes non processives puisque, après chaque clivage, le substrat doit être délié afin de permettre la libération du glucose de la poche du site actif (Gupta *et al.*, 2016). L'action de ces enzymes sur le cellobiose est considérée comme l'étape limitante de la réaction d'hydrolyse car elle est impliquée dans la régulation de la vitesse d'hydrolyse en réduisant l'inhibition des endoglucanases et les exoglucanases par le cellobiose. La plupart des champignons cellulolytiques ne sécrètent que très peu de  $\beta$ -glucosidases, correspondant environ à 1% de l'ensemble des enzymes secrétées. Comme pour les exoglucanases qui sont inhibées par le cellobiose, les  $\beta$ -glucosidases sont inhibées par leur produit d'hydrolyse, le glucose.

Il existe, au sein des écosystèmes, un grand nombre de micro-organismes, dits cellulolytiques, capables de convertir la cellulose insoluble en sucres solubles. Parmi ces nombreux micro-organismes, on peut citer quelques bactéries du genre *Clostridium*, *Cellulomonas* mais également des insectes, des champignons tels qu'*Aspergillus*, *Trichoderma*... (Rabinovich *et al.*, 2002 ; Sun and Cheng, 2002).

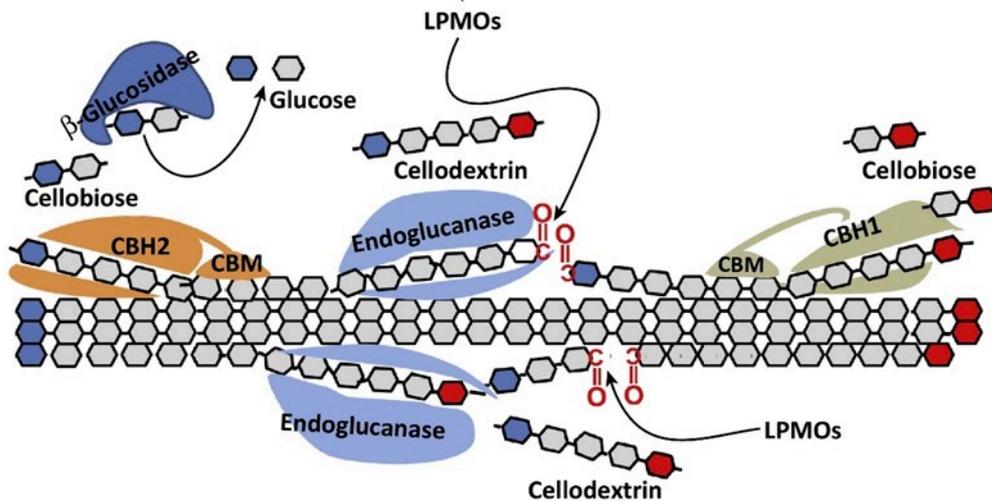
Par ailleurs, il a été rapporté que le champignon *Trichoderma reesei* libère un mélange de cellulases, dont au moins deux cellobiohydrolases, cinq endoglucanases, des  $\beta$ -glucosidases, représentant ainsi l'origine principale des cellulases

commerciales (Taherzadeh and Karimi, 2007). Bien que *T. reesei* libère des  $\beta$ -glucosidases, responsables de l'hydrolyse de la cellobiose formée en deux molécules de glucose, une supplémentation du mélange enzymatique par des  $\beta$ -glucosidases, sécrétées par d'autres microorganismes, principalement *Aspergillus niger*, semblerait être nécessaire. Ceci est dû au fait non seulement que ces enzymes sont produites en faible proportion par *T. reesei* mais aussi parce qu'elles possèdent une activité faible, ce qui limite la conversion du cellobiose en glucose (Hari Krishna *et al.*, 2001 ; Sánchez and Cardona, 2008). Sachant que ce dernier est un inhibiteur des endo et exoglucanases, son accumulation dans le milieu réduit considérablement l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Sánchez and Cardona, 2008). L'activité des cellulases est optimale pour une température comprise entre 40 et 50°C et un pH 4 – 5 (Hari Krishna *et al.*, 2001; Kádár *et al.*, 2004 ; Olofsson *et al.*, 2008a ; Zhao *et al.*, 2009 ; Zabed *et al.*, 2016).

#### 2.2.1.2. Les enzymes accessoires

En plus des glycosides hydrolases, une nouvelle famille d'enzymes oxydatives, agissant comme les monooxygénases lytiques de polysaccharides (LPMOs : lytic polysaccharide monooxygenases) a été rapportée (Harris *et al.*, 2010 ; Horn *et al.*, 2012 ; Hu *et al.*, 2014 ; Hemsworth *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2016; Bernardes *et al.*, 2019). Ces enzymes, selon la classification CAZymes (carbohydrate-active enzymes), sont désignées en tant qu'enzymes accessoires dotées d'une activité auxiliaire assistant les GH et sont sécrétées également par la plupart des microorganismes cellulolytiques dont les champignons (Gupta *et al.*, 2016). Les enzymes LPMOs dégradent les polysaccharides à travers un mécanisme oxydatif par opposition au mécanisme hydrolytique des GH. Les LPMOs appartenant à la famille AA9 (Auxiliary activity 9) ont été décrites comme agissant principalement sur la cellulose et le xyloglucanne (Quinlan *et al.*, 2011). Ces enzymes accessoires rendent la cellulose plus susceptible à l'hydrolyse par les GH conventionnelles et contribuent ainsi à la dégradation totale de la cellulose (Wahlström and Suurnäkki, 2015). D'autres LPMOs agissant sur la chitine (AA11) (Hemsworth *et al.*, 2014) et sur l'amidon (AA13) ont également été identifiées (Vu *et al.*, 2014 ; Lo Leggio *et al.*, 2015). Les LPMOs AA9 sont des enzymes cuivre-dépendantes dégradant la cellulose en oxydant les carbones en position 1 et/ou 4 du résidu de glucose, au sein des fibres de cellulose (Lombard *et al.*, 2014 ; Corrêa *et al.*, 2016 ; Frandsen *et al.*, 2016). Par conséquent, il a été

considéré que les GH agissent en synergie entre elles, mais aussi avec leurs homologues oxydatives, les LPMOs comme le montre la **Figure I.9**. Cette synergie est expliquée par le fait que les LPMOs AA9 attaquent la surface des fibres de cellulose alors que les cellulases hydrolysent les chaînes de cellulose (Gupta *et al.*, 2016).



**Figure I.9.** Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les cellulases et la rupture oxydative des liaisons glycosidiques par les enzymes accessoires, LPMOs montrant la synergie d'action entre ces enzymes (Gupta *et al.*, 2016)

Par conséquent, un système cellulolytique complet est requis pour une action hydrolytique synergique assurant la conversion efficace de la cellulose en glucose. Dans cette optique visant l'amélioration de l'efficacité enzymatique, d'autres alternatives comme l'utilisation des microorganismes modifiés génétiquement pour la production des cellulases optimales, font l'objet de nombreuses recherches. Ces cellulases optimales sont censées répondre à plusieurs caractéristiques telles qu'une machinerie hydrolytique complète agissant en synergie, une activité spécifique élevée, une adsorption sélective à la cellulose, et une sensibilité réduite à l'inhibition par le cellobiose et le glucose (Maki *et al.*, 2009). Ceci permettrait d'améliorer l'activité des cellulases et d'optimiser les conditions de la catalyse enzymatique, ce qui pourrait être évidemment intéressant dans un processus « one-pot » de bioconversion de la BLC.

Le développement et l'optimisation des stratégies de recyclage et de récupération des enzymes pour une réutilisation efficace gagnent en intérêt afin de réduire les coûts de l'hydrolyse enzymatique et ainsi d'une façon globale, rendre le procédé de production du bioéthanol 2G plus rentable du point de vue économique. Les cellulases sont actuellement dotées d'une importance industrielle grandissante.

Elles représentent environ 20% des enzymes commercialisées dans le monde (Srivastava *et al.*, 2018). De plus, il est prévu que la demande en cellulases soit amplifiée avec le développement industriel de biocarburants de deuxième génération (Behera and Ray, 2016).

### *2.2.1.3. Paramètres affectant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose*

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose représente un processus complexe faisant intervenir plusieurs facteurs interdépendants. Les propriétés structurales de la cellulose, la composition chimique de la BLC, la nature, la synergie et mode d'action des enzymes ainsi que le milieu réactionnel (température et pH) sont autant de paramètres qui influencent l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Cependant, les propriétés morphologiques et physico-chimiques de la BLC sont les principaux facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. La répartition des lignines, des hémicelluloses et des protéines dans la BLC peut avoir un impact considérable sur la conversion de cellulose en glucose.

La présence des lignines, au sein de la BLC, constitue un facteur de limitation important de l'activité des cellulases selon deux aspects. En effet, les lignines confèrent à la matrice lignocellulosique une résistance mécanique en se liant de manière covalente à l'hémicellulose et à la cellulose. Elles forment ainsi une barrière physique réduisant l'accès des cellulases à la cellulose (Meunier-Goddik and Penner, 1999 ; Chang and Holtzapple, 2000 ; Laureano-Perez *et al.*, 2005). De plus, les lignines adsorbent irréversiblement les enzymes, entravant ainsi leur action sur la cellulose (Alvira *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2012). Comme une partie des cellulases est bloquée par cette adsorption non-réactive, la cinétique d'hydrolyse enzymatique est affectée. Toutefois, il a été rapporté que l'adsorption des lignines aux cellulases dépend principalement de la nature et de l'origine des lignines (Zhao *et al.*, 2012).

Similairement aux lignines, les hémicelluloses exercent un rôle en tant que barrière physique réduisant l'accessibilité des cellulases avec toutefois un effet moindre comparées aux lignines (Zhao *et al.*, 2012). L'acétylation des hémicelluloses qui peut varier entre 1 et 6% de la BLC selon l'espèce végétale (Peng *et al.*, 2012) est considérée exercer un rôle important dans la résistance contre l'hydrolyse enzymatique (Alvira *et al.*, 2010). Les groupements acétyles sont supposés ralentir le taux d'hydrolyse enzymatique. En outre, ils semblent gêner l'établissement de la

liaison entre la cellulose et le domaine catalytique des cellulases en augmentant le diamètre des chaînes de cellulose, ce qui génère un encombrement stérique des enzymes (Pan *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2012).

Les facteurs liés au substrat se réfèrent aux propriétés physiques de la cellulose, incluant le degré de polymérisation, le taux de cristallinité ainsi que la surface spécifique, la taille des particules et la porosité.

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose induit une diminution de son degré de polymérisation, c'est pourquoi ce dernier est considéré comme facteur important à considérer lors de l'hydrolyse enzymatique. Il est rapporté que le taux d'hydrolyse enzymatique est inversement proportionnel au degré de polymérisation (Gupta and Lee, 2009). Néanmoins, d'autres auteurs ont avancé que le rendement final de l'hydrolyse enzymatique n'était pas affecté par le degré de polymérisation initial de la cellulose (Del Rio *et al.*, 2012).

Concernant le taux de cristallinité de la cellulose, certaines études ont démontré que les régions amorphes sont préférentiellement et premièrement hydrolysées par les cellulases en considérant la cristallinité comme un facteur défavorable dans l'hydrolyse enzymatique (Zhang and Lynd, 2004 ; Park *et al.*, 2010).

Lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, les enzymes doivent pénétrer un réseau de capillaires et de pores afin d'accéder à toutes les régions hydrolysables (Wong *et al.*, 1988). C'est pourquoi l'accessibilité des cellulases dépend de la surface spécifique qui est étroitement liée à taille des particules et au volume des pores. En effet, les rendements d'hydrolyse enzymatique sont améliorés quand la taille des pores du substrat cellulosique est plus grande que celle des molécules d'enzymes (Peciulyte *et al.*, 2015).

### 2.2.2. Hydrolyse enzymatique des hémicelluloses

En se basant sur le concept de la bioraffinerie, il est admis que le procédé de production du bioéthanol 2G n'est viable économiquement et ne pourra être commercialisé que si les trois constituants de la BLC sont valorisés (Binder and Raines, 2010). Dans ce contexte, la bioconversion de l'hémicellulose d'abord en sucres fermentescibles puis en éthanol est essentielle.

L'hydrolyse des hémicelluloses en monosaccharides peut se faire dans des conditions douces et respectueuses de l'environnement en mettant en œuvre des enzymes, les hémicellulases. Celles-ci facilitent l'hydrolyse de la cellulose en exposant les fibres de cellulose, ce qui les rend plus accessibles à la dégradation enzymatique (Shallom and Shoham, 2003).

Les hémicellulases sont des enzymes à domaines multiples et contiennent généralement des modules catalytiques et non catalytiques structurellement distincts. En se basant sur la séquence de leurs domaines catalytiques, les hémicellulases sont soit des glycosides hydrolases (GH) catalysant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, soit des estérases (CE) (carbohydrate estérase) hydrolysant les liaisons ester des groupes latéraux d'acétate ou d'acide férulique (Saha, 2003 ; Gírio *et al.*, 2010).

#### *2.2.2.1. Hydrolyse enzymatique des xylanes*

Du fait que le xylane représente le composant majoritaire de l'hémicellulose, la plupart des recherches se sont concentrées sur l'étude des hémicellulases impliquées dans son hydrolyse, notamment les xylanases.

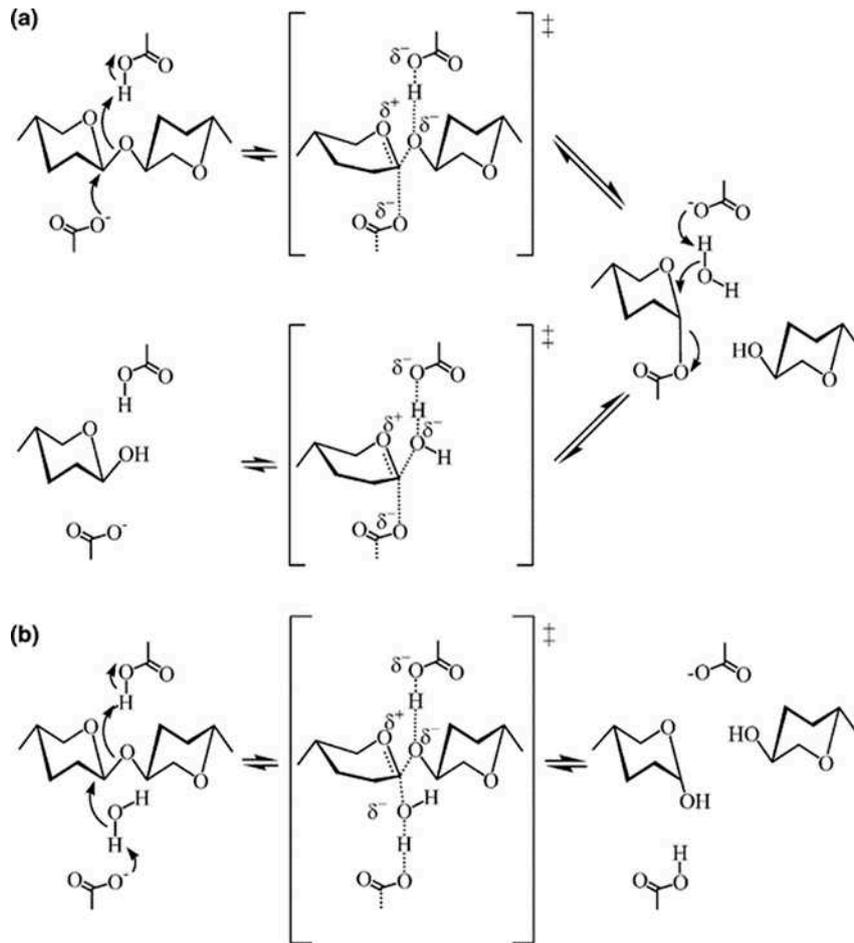
Initialement dénommées pentosanases en 1955, les xylanases ont été reconnues par l'Union Internationale de la Biochimie et la Biologie Moléculaire (IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology) en 1961 lorsque le code d'enzyme « EC 3.2.1.8 » leur a été attribué (Collins *et al.*, 2005). Bien que ces enzymes soient officiellement dénommées endo-1,4- $\beta$ -xylanases, elles sont aussi connues sous d'autres synonymes tels que xylanases, endoxylanases, 1,4- $\beta$ -D-xylane-xylanohydrolase, endo-1,4- $\beta$ -D-xylanases,  $\beta$ -1,4-xylanases et  $\beta$ -xylanases.

Les xylanases, des glycosides hydrolases (GH) catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\beta$ -1,4-D-xylosidiques au sein du xylane. Elles sont réparties en plusieurs familles (GH5, 7, 8, 10, 11, 26, 30 et 43) dont les familles 10 et 11 sont le plus étudiées (Collins *et al.*, 2005 ; Moreira and Filho, 2016). Les xylanases appartenant à la famille GH11 agissent préférentiellement entre deux résidus xylose non substitués (Deutschmann and Dekker, 2012) tandis que les xylanases de la famille GH10 hydrolysent la liaison entre deux xyloses dont l'un est substitué (Biely *et al.*, 1997).

Les xylanases catalysent l'hydrolyse du xylane par un mécanisme de rétention ou d'inversion de la configuration stéréochimique du carbone anomérique (Collins *et*

*al.*, 2005 ; Dodd and Cann, 2009 ; Moreira and Filho, 2016). Les deux mécanismes font intervenir deux résidus d'acides carboxyliques dans le domaine catalytique de l'enzyme. L'hydrolyse par rétention (GH5, 7, 8, 10, 11 et 43) correspondant à un mécanisme de double déplacement résulte de deux réactions de substitution (**Figure I.10 a**). En effet, les deux résidus d'acides carboxyliques sont impliqués dans la formation d'un intermédiaire covalent enzyme-substrat. Le premier acide carboxylique agit comme un catalyseur acide en protonant le substrat alors que le second réalise une attaque nucléophile libérant le résidu xylose à proximité et formant l'intermédiaire  $\alpha$ -glycosyl-enzyme (inversion  $\beta$  à  $\alpha$ ). Durant la deuxième réaction de substitution, le premier carboxylate, fonctionnant comme une base, arrache un proton d'une molécule d'eau nucléophile qui rendue « activée » attaque le carbone anomérique. Le produit en configuration  $\beta$  est ensuite libéré et la configuration stéréochimique du carbone anomérique est ainsi maintenue (Collins *et al.*, 2005 ; Dodd and Cann, 2009).

En revanche, l'hydrolyse par inversion (GH8 et 43) fait également intervenir une paire de résidus d'acides carboxyliques mais résulte d'un seul déplacement (**Figure I.10 b**). Le premier acide carboxylique provoque la libération du résidu xylose à proximité tandis que le second carboxylate, agissant comme une base active une molécule d'eau nucléophile qui attaque le carbone anomérique. Ceci entraîne la rupture de la liaison glycosidique et la libération du produit avec une inversion de la configuration du carbone anomérique (Rye and Withers, 2000 ; Collins *et al.*, 2005 ; Dodd and Cann, 2009).



**Figure I.10.** Mécanismes d'hydrolyse des xylanases par (a) rétention ou (b) inversion de la configuration stéréochimique du carbone anomérique (Collins *et al.*, 2005)

Ces enzymes impliquées dans la production du xylose, une source de carbone principale pour le métabolisme cellulaire, et dans l'infection des cellules végétales par les agents pathogènes sont produites par divers organismes incluant des bactéries, des algues, des champignons, des protozoaires, des gastropodes et des arthropodes (Collins *et al.*, 2005). Excrétant les enzymes dans le milieu extracellulaire, les champignons filamenteux sont considérés comme des producteurs potentiels de xylanases dont le niveau est largement élevé par rapport à celles des bactéries et des levures. Ainsi, les souches de *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma koningii* sont les principales sources industrielles de xylanases commerciales (Polizeli *et al.*, 2005).

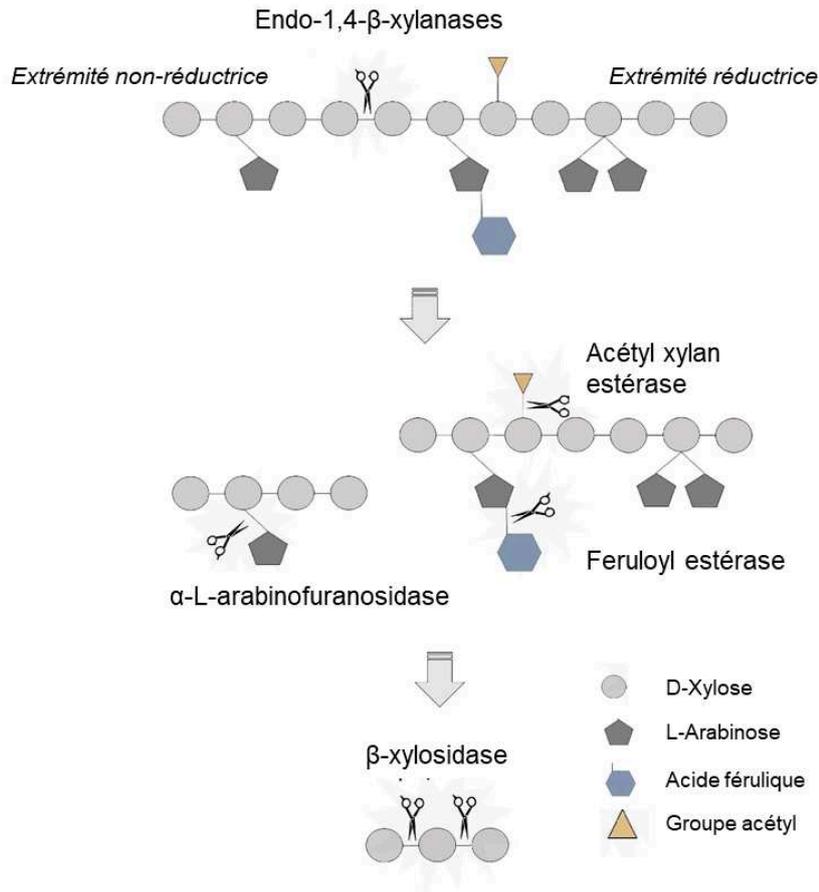
Par ailleurs, certains micro-organismes présentent la caractéristique de produire non seulement une variété d'enzymes xylanolytiques mais aussi particulièrement des xylanases multiples. Ces xylanases pourraient présenter des propriétés physico-

chimiques, des structures et des rendements divers mais notamment des spécificités distinctes vis-à-vis du substrat, augmentant ainsi l'efficacité de l'hydrolyse. Parmi ces micro-organismes produisant des isoenzymes de xylanases, on peut citer à titre d'exemple, les souches d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* qui excrètent 15 et 13 xylanases extracellulaires, respectivement (Biely, 1985). La production d'isoenzymes pourrait être attribuée à une redondance génétique du gène codant pour cette protéine (Wong *et al.*, 1988), mais également à des modifications post-traductionnelles (Biely, 1985).

Compte tenu de sa complexité et son hétérogénéité, l'hydrolyse enzymatique complète du polymère de xylane requiert une large variété d'enzymes coopératives agissant en synergie (Liao *et al.*, 2014) (**Figure I.11**). Les enzymes, ayant une fonction de dépolymérisation attaquent la chaîne principale des xylanes :

- Les endo 1,4- $\beta$ -D-xylanases (EC 3.2.1.8) coupent aléatoirement la chaîne principale du xylane, aboutissant initialement à des oligomères de  $\beta$ -D-xylopyranosyl comme produits principaux d'hydrolyse, puis en deuxième lieu, des mono-, di- et trisaccharides de  $\beta$ -D-xylopyranosyl pourraient être produits (Polizeli *et al.*, 2005).
- Les  $\beta$ -D-xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent la liaison xylosidique entre les unités  $\beta$ -D-xylopyranosyl de l'extrémité non réductrice des xylobioses (2 monomères de xylose) et des xylo-oligosaccharides.

Par ailleurs, l'élimination des substituants et groupements latéraux est catalysée par diverses enzymes telles que l' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), l' $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139), l'acétyl xylane estérase (EC 3.1.1.72), la féruloyl estérase (EC 3.1.1.73) et l'acide-p-coumarique-estérase (EC 3.1.1.-). Ces enzymes accessoires sont responsables de l'élimination des obstacles spatiaux qui empêchent la formation des complexes enzyme-substrat au sein de la chaîne principale (Valenzuela *et al.*, 2014 ; Moreira and Filho, 2016). Ainsi, l'élimination de ces ramifications réduirait l'encombrement stérique des xylanases et accélérerait le taux de dépolymérisation de la chaîne principale des xylanes.



**Figure I.11.** Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique du xylane impliquant une multitude d'enzymes agissant en synergie (Gupta *et al.*, 2016)

Outre les glycosides hydrolases et les estérases mentionnées ci-dessus, des monooxygénases lytiques de polysaccharides (LPMOs) spécifiques vis-à-vis des xylanes (AA14) ont été récemment découvertes (Couturier *et al.*, 2018). Similairement aux LPMOs AA9 décrites pour l'hydrolyse de la cellulose discutées plus haut, les LPMOs AA14 contribuent à la dégradation des xylanes par oxydation des carbones des résidus du xylose. Additionnées aux xylanases classiques, les LPMOs AA14 améliorent considérablement les rendements de bioconversion des xylanes (Couturier *et al.*, 2018).

Comme pour toutes les enzymes en milieu aqueux, le pH et la température sont les deux paramètres principaux influençant l'activité des xylanases. Toutefois, ces deux paramètres dépendent directement de l'origine (champignon, bactérie...) et de la nature du microorganisme (mésophile, thermophile, neutrophile...) produisant ces enzymes (Collins *et al.*, 2005). En effet, Michelin *et al.* (2016) ont étudié l'hydrolyse

enzymatique de bagasse de canne à sucre par des cellulases et des xylanases commerciales Cellic Ctec2, à 50°C et à pH 4,8. De même, Kaya *et al.* (2000) ont effectué l'étude de l'hydrolyse enzymatique du xylane à 50°C et à pH 4,8, en utilisant des préparations de xylanases (Irgazyme-40S, Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC). Par ailleurs, Moreira *et al.* (2013) en produisant des xylanases par *Aspergillus terreus* ont purifié et identifié deux xylanases Xyl T1 et Xyl T2 qui ont montré des meilleures activités pour des conditions optimales différentes (Xyl T1 : 50°C, pH 6,0 alors que Xyl T2 : 45°C et pH 5,0). En outre, Yasuda *et al.* (2014) ont étudié l'hydrolyse enzymatique d'une biomasse herbacée (napiegrass) par des cellulases commerciales de *Acremonium cellulolyticus* et des xylanases commerciales de *Trichoderma longibrachiatum*, à 45°C et pH 5,0.

D'autre part, la répartition des lignines au sein de la BLC constitue une barrière physique limitant l'accessibilité des xylanases aux fractions hydrolysables du xylane, similairement à ce qui a été décrit pour les cellulases. Par ailleurs, les lignines peuvent également empêcher l'accès des enzymes au xylane en s'adsorbant aux xylanases dans les solutions alcalines (Ryu and Kim, 1998). Il est supposé que l'adsorption des xylanases aux lignines est possiblement due aux interactions physiques de type Van der Waals au sein de la surface hydrophobe des lignines. En revanche, il a été démontré que la présence du domaine de liaison au substrat (le xylane) augmente l'adsorption des xylanases et l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique du xylane, tout en réduisant l'adsorption des xylanases aux lignines (Zhang *et al.*, 2013).

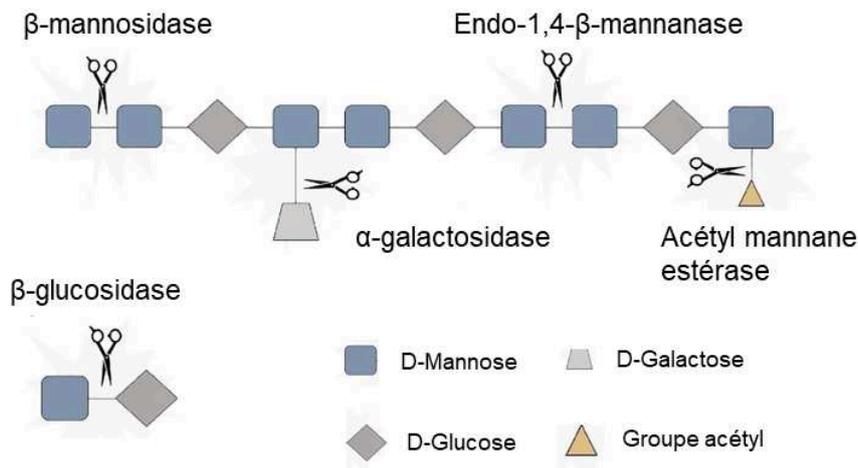
De plus, plusieurs études ont avancé que les composés phénoliques dérivés des lignines pourraient affecter l'activité des xylanases (**Tableau I.3**).

**Tableau I.3.** Effet de composés phénoliques sur l'activité des xylanases

Enzyme	Source	Effet du composé phénolique	Référence
Xylanase	Cellic Ctec2 (Novozymes)	Inhibition par les composés phénoliques hydrosolubles et ceux extraits par acétone	(Michelin <i>et al.</i> , 2016)
Xylanase	<i>Thermobacillus xylanolicus</i>	Inactivation par les acides cinnamique, p-coumarique, caféique, férulique et tri-méthoxy cinnamique	(Boukari <i>et al.</i> , 2011)
Xylanase Multifect	Préparations commerciales d'une souche de <i>Trichoderma reesei</i> , génétiquement modifiée	Inhibition par des préparations de lignine des résineux	(Berlin <i>et al.</i> , 2006)
Xylanase (XylT1)	<i>Aspergillus terreus</i>	Inhibition par la vanilline et les acides p-coumarique, férulique, cinnamique et 4-hydroxybenzoïque	(Moreira <i>et al.</i> , 2013)
Xylanase (XylT2)	<i>Aspergillus terreus</i>	Résistance à la vanilline et aux acides p-coumarique, férulique, cinnamique et 4-hydroxybenzoïque	(Moreira <i>et al.</i> , 2013)
Préparation de xylanase	Igrazyme-40S	Amélioration de l'activité enzymatique en présence des lignines et de la liqueur noire issus du procédé kraft	(Kaya <i>et al.</i> , 2000)
Préparation de xylanase	Igrazyme-40S	Amélioration de l'activité enzymatique en présence de faibles concentrations en acides vanillique et protocatéchique et en acétovanillone. A des concentrations élevées, ces mêmes composés inhibent l'enzyme	(Kaya <i>et al.</i> , 2000)
Xylanase (X22)	<i>Emericela nidulans</i>	Résistance à la vanilline et aux acides férulique, p-coumarique et 4-hydroxybenzoïque	(Silva <i>et al.</i> , 2015)

**2.2.2.2. Hydrolyse enzymatique des mannanes**

Les mannanes, particulièrement les galactoglucomannanes (GGM) largement répandus dans les bois de résineux, consistent en une chaîne linéaire d'unités  $\beta$ -D-mannopyranosyl (Manp) et  $\beta$ -D-glucopyranosyl (GlcP) liées par des liaisons glycosidiques ( $\beta$ -1,4), partiellement acétylées en position C2 ou C3 et substituées par des résidus  $\alpha$ -D-galactopyranosyl attachés au mannose et glucose par des liaisons ( $\alpha$ -1,6). On note qu'au sein de la chaîne linéaire des GGM, le ratio GlcP : Manp est plus faible (Gírio *et al.*, 2010). Pour cela, leur hydrolyse complète nécessite l'action synergique de plusieurs enzymes telles que l'endo-1,4- $\beta$ -D-mannanase (EC 3.2.1.78), clivant d'une manière aléatoire la chaîne principale des GGM, et la  $\beta$ -mannosidase (EC 3.2.1.25), agissant sur l'extrémité non réductrice de ces chaînes. De plus, d'autres enzymes supplémentaires comme la  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21), l' $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22), et l'acétyl mannane estérase sont requises pour l'hydrolyse des chaînes latérales attachées aux mannanes à des points variés (**Figure I.12**) (Dhawan and Kaur, 2007). Toutefois, les enzymes impliquées dans l'hydrolyse de ce polymère restent largement négligées.



**Figure I.12.** Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique du galactoglucomannane impliquant différentes hémicellulases (Gupta *et al.*, 2016)

Divers microorganismes incluant des bactéries, des actinomycètes, des levures ainsi que des champignons sont connus pour leur capacité à dégrader les mannanes. Il a été rapporté que les mannanases d'origine microbienne sont exprimées

constitutivement et peuvent être secrétées dans le milieu extracellulaire (Gírio *et al.*, 2010).

Bien que les sources bactériennes produisant des mannanases soient nombreuses, seulement un nombre restreint d'entre elles est exploité à l'échelle commerciale. Parmi les bactéries, de type sauvage ou recombinant, utilisées pour produire commercialement des mannanases, on peut citer les exemples les plus importants : *Bacillus stearothermophilus*, *Streptomyces stearothermophilus*, *Caldibacillus cellulovorans* et *Caldocellum saccharolyticum* (Sunna *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2006).

### **3. Prétraitement de la (ligno)cellulose**

La production du bioéthanol 2G via la voie biochimique passe généralement par trois étapes avant la récupération du bioéthanol par distillation. Cette bioconversion débute par une étape de prétraitement considérée comme cruciale pour affecter la structure physique rigide de la BLC, diminuer sa récalcitrance à la biodégradation et exposer plus efficacement les polysaccharides à l'attaque enzymatique pour assurer, en conséquence, une fermentation éthanolique à un meilleur rendement par les cellules microbiennes.

#### **3.1. Objectifs et différentes techniques**

L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique dépend fortement de la capacité des enzymes à accéder aux fractions polysaccharidiques hydrolysables. Dans la BLC, les différents biopolymères de la paroi végétale forment une matrice complexe qui a pour but d'assurer la rigidité de la paroi et de protéger la cellulose des agents pathogènes. L'enchevêtrement des polymères ainsi que la couche de lignine entourant les microfibrilles limitent considérablement l'efficacité de l'hydrolyse. Afin de surmonter cette récalcitrance à la dégradation, une étape de prétraitement de la BLC est nécessaire. D'une manière générale, les principaux objectifs du prétraitement sont de (i) désorganiser ou déstructurer l'architecture tridimensionnelle de la BLC en augmentant sa porosité, (ii) redistribuer les hémicelluloses et la lignine dans la paroi végétale, (iii) réduire la taille macroscopique et microscopique des particules, et (iv) altérer la structure du polymère de cellulose en diminuant sa cristallinité ou son degré

de polymérisation (Wyman *et al.*, 2005b ; Sánchez and Cardona, 2008 ; Zabed *et al.*, 2016).

Différentes techniques de prétraitement ont été rapportées dans la littérature et peuvent être classées en plusieurs catégories (Hendriks and Zeeman, 2009 ; Zhao *et al.*, 2012 ; Haghghi Mood *et al.*, 2013 ; Saini *et al.*, 2015). Les prétraitements biologiques (a) faisant intervenir des microorganismes et/ou des champignons lignocellulolytiques, capables de dégrader des polysaccharides et/ou les lignines ; les prétraitements physiques (b) faisant appel aux broyages mécaniques, à l'extrusion et agissant en réduisant la taille des particules et la cristallinité de la lignocellulose ; les prétraitements chimiques (c) qui sont conduits, dans la plupart des cas, sous conditions agressives, ils permettent la désorganisation structurale de la lignocellulose, soit en milieu acide dilué/concentré (acide sulfurique, chlorhydrique, nitrique ou phosphorique) ou en milieu alcalin (hydroxyde de sodium, de potassium de calcium ou d'ammonium), soit en appliquant de solvants organiques ou des liquides ioniques ; les prétraitements physico-chimiques (d) renfermant les procédés Organosolv, l'explosion à la vapeur, l'expansion des fibres par l'ammoniaque (AFEX), le CO<sub>2</sub> supercritique ; et les prétraitements basés sur la combinaison de plusieurs approches (e) tels que le prétraitement à l'acide dilué combiné aux liquides ioniques (Auxenfans *et al.*, 2014a), le prétraitement aux liquides ioniques combiné aux ultrasons (Yu *et al.*, 2018), le prétraitement séquentiel à l'acide dilué et à l'hydroxyde de sodium (Lee *et al.*, 2015), le prétraitement combinant l'extrusion et le CO<sub>2</sub> (Wu *et al.*, 2018).

Le choix d'un prétraitement dépend de la nature de la BLC mais également des considérations économiques et environnementales. De plus, l'intégrité et la non-altération des biopolymères constitutifs de la BLC, l'absence ou la minimisation des coproduits inhibiteurs issus de la dégradation des sucres et/ou les lignines, qui sont considérés inhibiteurs des étapes ultérieures et la réduction de la consommation de l'énergie sont autant de facteurs qui déterminent l'efficacité du prétraitement (Zheng *et al.*, 2009 ; Tadesse and Luque, 2011).

## 3.2. Prétraitement aux liquides ioniques

### 3.2.1. Généralités

L'utilisation, en continu, de grandes quantités de solvants organiques en tant que milieu liquide pour des réactions chimiques, des réactions d'extraction ainsi que des réactions de formulations est devenue une préoccupation majeure de l'industrie chimique. De par leur volatilité et leur inflammabilité, les solvants organiques classiques montrent un effet délétère sur la santé et la sécurité humaine mais également sur l'environnement. Ces perceptions ont engendré un intérêt grandissant pour minimiser leur utilisation et les remplacer par de nouvelles alternatives telles que le CO<sub>2</sub> supercritique, les systèmes aqueux biphasiques et les liquides ioniques (LI).

Les LI sont des sels organiques stables à des températures allant jusqu'à 300°C, liquides à des températures inférieures à 100°C, dont certains possèdent la propriété d'être liquides à température ambiante. Ces derniers sont désignés par le terme « Room Temperature Ionic Liquids (RTILs) (Huddleston *et al.*, 2001). De plus, des LI liquides à des températures aussi basses que -96°C ont aussi été décrits (Holbrey and Seddon, 1999). Les LI sont constitués uniquement d'ions, un cation organique et un anion inorganique ou organique (Huddleston *et al.*, 2001). L'anion constitutif des LI semble contrôler la miscibilité à l'eau de celui-ci mais le cation peut aussi influencer l'hydrophobicité et la capacité d'établir des liaisons hydrogène (Suarez *et al.*, 1998 ; Visser *et al.*, 2000). Les sels inorganiques simples comme par exemple le chlorure de sodium (NaCl) se transforment à l'état liquide à des températures très élevées allant jusqu'à 803°C, c'est pourquoi leur utilisation en tant que solvants pour des réactions chimiques n'est pas pratiquement faisable (Tadesse and Luque, 2011). Le fait que les LI soient liquides à des températures inférieures à 100°C est attribué à la différence de taille entre cation et anion, l'encombrement et l'asymétrie du cation ainsi que la délocalisation de charges sur certains atomes. Ceci engendre des forces électrostatiques (ou coulombiennes) plus faibles et une énergie réticulaire (du cristal) infime ce qui empêche ainsi la cristallisation (Huddleston *et al.*, 2001 ; Gorke *et al.*, 2010).

En 1914, l'éthylammonium nitrate ( $[(C_2H_5)NH_3]^+[NO_3]^-$ ) fut le premier RTIL rapporté (point de fusion de 13-14°C) synthétisé par le chimiste Paul Walden en neutralisant l'éthylamine avec de l'acide nitrique concentré (Plechkova and Seddon,

2008). En, 1951, les chloroaluminates furent identifiés en tant que LI de première génération mais ce n'est qu'à partir des années 1970 que la recherche sur ces LI s'intensifia notamment dans leur utilisation comme électrolytes dans les batteries (Hurley and Wier, 1951 ; Robinson and Osteryoung, 1979 ; Wilkes *et al.*, 1982). Néanmoins, l'inconvénient majeur de ces LI résidait dans leur instabilité dans l'eau et à l'air.

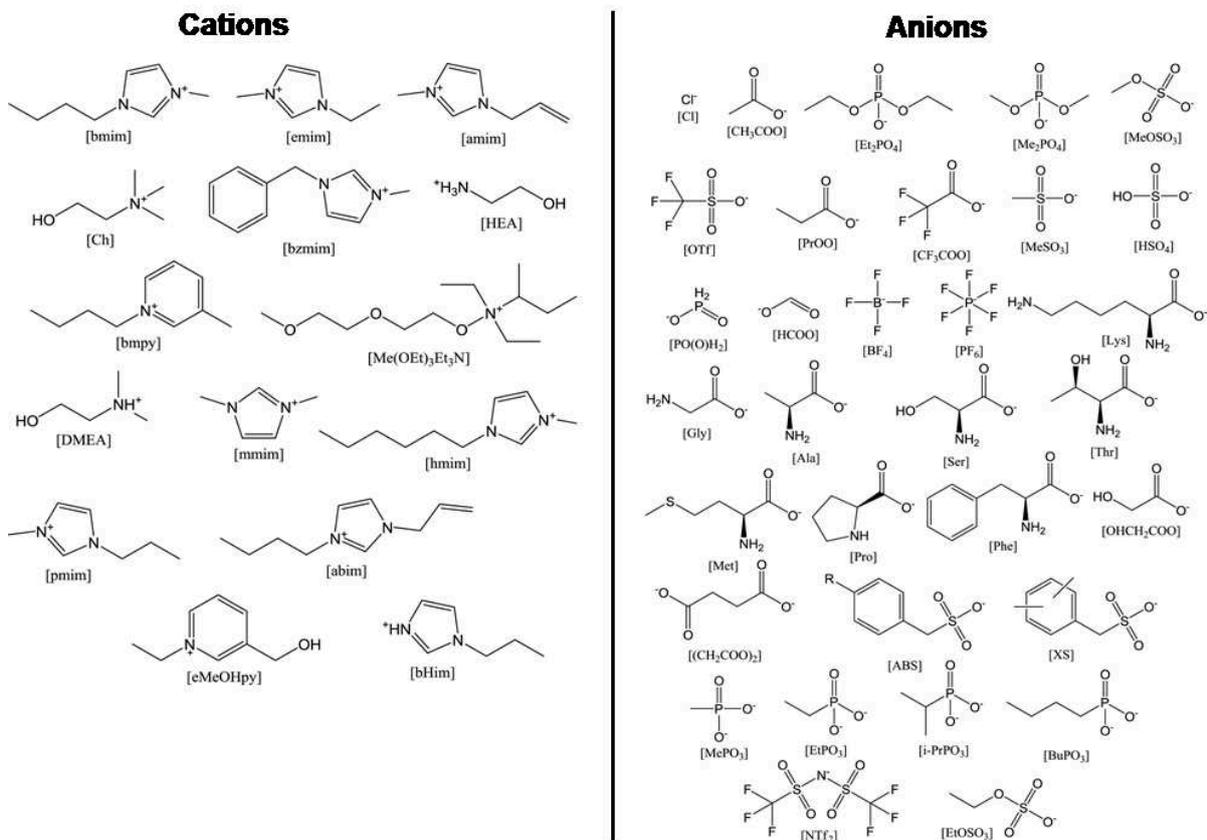
En 1992, le LI 1-éthyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate, [Emim][BF<sub>4</sub>], à l'origine des LI de deuxième génération, stables à l'air, fut synthétisé (Tadesse and Luque, 2011). Dès lors, de nombreux LI dérivés de cette famille furent développés en variant la nature du cation et de l'anion ainsi que leurs substituants.

Certains LI présentent des caractéristiques intéressantes de par leur stabilité thermique, leur non inflammabilité et leur faible volatilité. Pour ces raisons, ils sont considérés comme plus respectueux de l'environnement et moins dangereux que les solvants organiques classiques (Zhu *et al.*, 2006). Grâce à leurs propriétés particulières et à leur grande diversité, les LI se sont développés dans de nombreux domaines de la chimie et possèdent des applications très variées (synthèse chimique, (bio)catalyse, électrolyte de batterie, lubrifiants, agent d'absorption de gaz, ou additifs pour les matériaux).

Plus récemment, les LI ont démontré leur efficacité en tant que solvants pour la dissolution de la (ligno)cellulose et l'amélioration de sa digestibilité enzymatique (Swatloski *et al.*, 2002 ; Bose *et al.*, 2010). C'est sur cette application qu'on mettra l'accent dans cette étude.

Les LI peuvent être synthétisés à partir de très nombreuses combinaisons de cations ou d'anions qui pourraient être estimées à 10<sup>9</sup> combinaisons possibles (Mora-Pale *et al.*, 2011). Ainsi, les propriétés physico-chimiques des LI (polarité, viscosité, point de fusion, capacité d'établir des liaisons hydrogène) peuvent être modulables en fonction des combinaisons cation/anion mais également selon les substituants du cation, notamment en variant la longueur de la chaîne alkyle. Les combinaisons les plus communes des LI actuels sont à base de cations organiques tels que les ions ammoniums quaternaires, les phosphoniums quaternaires et les cations aromatiques hétérocycliques dont l'imidazolium, et le pyridinium (**Figure I.13**). Quant à l'anion

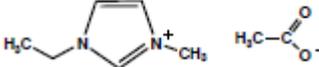
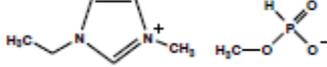
constitutif du LI, il peut être organique ou inorganique, aliphatique ou cyclique, polyatomique ou même mono-atomique (cas des anions halogénés) (**Figure I.13**).



**Figure I.13.** Exemples de cations et d'anions les plus utilisés dans la synthèse des LI (Da Costa Lopes *et al.*, 2013)

Dans cette étude, deux LI hydrophiles à base d'imidazolium, le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], ont été sélectionnés pour le prétraitement de la cellulose et les substrats lignocellulosiques (**Tableau I.4**). Ces LI dont la chaîne latérale de leur cation (imidazolium) ne dépasse pas les 4 atomes de carbone peuvent être considérés comme plus avantageux et plus respectueux de l'environnement car il semblerait admis que la toxicité des LI est directement proportionnelle à la longueur des chaînes alkyles (Quijano *et al.*, 2011) tandis que leur biodégradabilité est inversement proportionnelle à celle-ci (Stolte *et al.*, 2008). En d'autres termes, plus les chaînes alkyles sont longues, plus les LI seraient toxiques et moins ils seraient biodégradables.

**Tableau I.4.** Propriétés physico-chimiques des deux LI utilisés dans cette étude (d'après Solvionic SA)

Nom du liquide ionique	1-éthyl-3méthylimidazolium acétate [Emim][OAc]	1-éthyl-3méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]
		
Référence pour la synthèse	(Wilkes and Zaworotko, 1992)	(Fukaya <i>et al.</i> , 2008)
Masse molaire (g/mol)	170,22	206,18
Point de fusion	< -20°C	-
Densité	1,03	-
Viscosité (à 25°C)	93 cP	107 cP
Propriétés	Hydrophile	Hydrophile
Miscibilité	Eau, acétonitrile, acétone, dichlorométhane	Eau, méthanol, éthanol et partiellement dans l'acétone
Immiscibilité	Diéthyl éther	Toluène, hexane, diéthyl éther

### 3.2.2. Solubilisation de la cellulose dans les LI

De par sa nature cristalline, la cellulose n'est pas soluble dans l'eau ni dans les solvants organiques (Wahlström and Suurnäkki, 2015). Des solvants comme l'acide trifluoroacétique, les sels fondus ou les LI peuvent pourtant la solubiliser (Nagarajan *et al.*, 2017). Les LI sont considérés, de par leurs propriétés discutées ci-dessus, comme solvants amphiphiles plus « verts » permettant la solubilisation de la cellulose. Une fois solubilisée, la forme irréversible et thermodynamiquement plus stable de la cellulose, la cellulose II, peut être régénérée par précipitation en ajoutant un anti-solvant comme par exemple l'eau, l'éthanol, le méthanol ou l'acétone (Lee *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009).

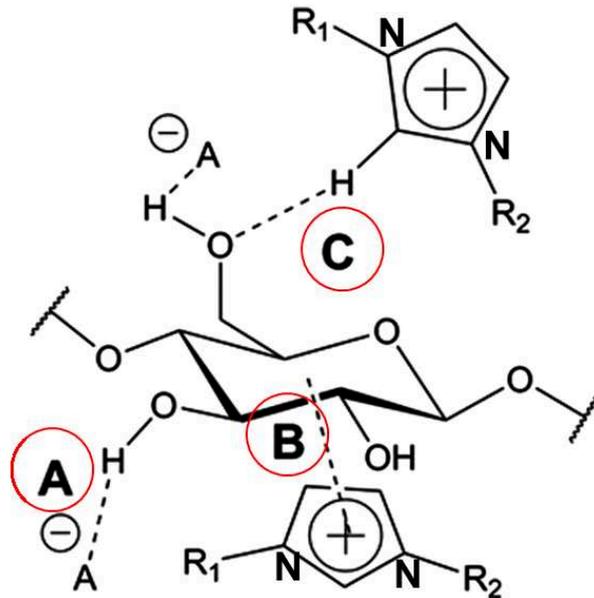
Toutefois, la dissolution de la cellulose dans les LI n'est pas un concept nouveau. La faisabilité d'un LI à base de pyridine, le N-éthylpyridinium chlorure à solubiliser la cellulose fut reportée par Charles Graenacher en 1934. Ce n'est qu'en 2002 que la dissolution de la cellulose dans un autre LI, le 1-méthyl-3-butyl imidazolium chlorure fut à nouveau mise en évidence (Swatloski *et al.*, 2002). Ces deux rapports

sont considérés comme les précurseurs de base qui ont mis en place le développement des LI pour la dissolution de la cellulose.

D'une manière générale, un solvant solubilisant la cellulose requiert la capacité d'interagir avec les groupements hydroxyles des résidus de glucose et donc d'éliminer, au moins partiellement les fortes liaisons hydrogène intermoléculaires entre les chaînes du polymère (Medronho and Lindman, 2014). Les LI solubilisant la cellulose sont généralement hydrophiles alors que les LI hydrophobes ne solubilisent ni la cellulose ni d'autres polysaccharides (Zhao *et al.*, 2008).

Il est considéré que la dissolution de la cellulose est basée sur la rupture des liaisons hydrogène intra- et inter- chaînes de cellulose et la formation de nouvelles liaisons hydrogènes entre les les protons des groupements hydroxyles de la cellulose et l'anion du LI (Shill *et al.*, 2011 ; Tadesse and Luque, 2011). Par conséquent, l'anion semble déterminer la capacité du LI à solubiliser la cellulose étant donné qu'il exercerait le rôle d'un donneur d'électrons dans le complexe donneur – accepteur d'électrons se formant entre les anions du LI et les hydroxyles équatoriaux de la cellulose (**Figure I.14**) (Swatloski *et al.*, 2002). Cette hypothèse a été démontrée par des études RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de solutions de cellulose dans le 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure ([Bmim][Cl]) qui ont mis en évidence les interactions entre l'ion chlorure et les groupements hydroxyles de cellulose (Rensing *et al.*, 2006). Typiquement, l'ion chlorure, acétate, formate, phosphate ou alkyl phosphonate sont perçus comme les plus susceptibles à établir des liaisons hydrogènes avec la cellulose (Shill *et al.*, 2011). Toutefois, les LI 1-alkyl-3-méthylimidazolium chlorure ([C<sub>n</sub>mim][Cl]) (où n est le nombre de carbones dans la chaîne alkyle), qui ont été typiquement utilisés pour solubiliser la cellulose sont solides à température ambiante et se caractérisent par une viscosité élevée après fusion (>2000 centipoise (cP) à 25°C). De plus, il a été démontré que la solubilisation de la cellulose dans les [C<sub>n</sub>mim][Cl] est très sensible à l'eau, à tel point que 1% d'eau pourrait affecter la solubilisation de la cellulose (Swatloski *et al.*, 2002). Les LI à base de l'anion acétate ou phosphonate sont liquides à température ambiante et se caractérisent par une faible viscosité (66 - 500 cP à 25°C) et une importante capacité d'accepteur de liaison hydrogène (Mora-Pale *et al.*, 2011). Toutes ces caractéristiques faciliteraient la solubilisation de la cellulose, c'est pourquoi les LI à base d'acétate et

d'alkylphosphonate suscitent plus d'attention (Fukumoto *et al.*, 2005 ; Fukaya *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2009).



**Figure I.14.** Mécanisme de dissolution de la cellulose dans les LI à base d'imidazolium (A) interactions entre l'anion basique et les protons des groupements hydroxyles de la cellulose, (B) interactions hydrophobes entre la partie hydrophobe de la cellulose et le noyau imidazolium, (C) interactions entre le proton acide du noyau imidazolium (en position C-2) et les atomes d'oxygène des groupements hydroxyles de la cellulose (d'après Wahlström and Suurnäkki, 2015)

Par ailleurs, des modèles empiriques fournissant une analyse quantitative des propriétés de solvation des LI ont été développés, le plus commun étant le modèle de Kamlet-Taft (Crowhurst *et al.*, 2006 ; Fukaya *et al.*, 2008). Ce modèle représente un modèle (température-dépendant) pratique permettant de déterminer la polarité d'un solvant et sa capacité d'interaction avec les solutés à travers trois paramètres caractéristiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\pi^*$ ). Le paramètre  $\alpha$  reflète la capacité de donneur de liaison hydrogène (ou acidité de liaison hydrogène) alors que  $\beta$  rend compte de la capacité d'accepteur de liaison hydrogène (ou basicité de liaison hydrogène) et le paramètre  $\pi^*$ , quant à lui, détermine la polarisabilité/dipolarité du solvant. Ces paramètres peuvent être mesurés par spectroscopie UV/visible en présence de colorants spécifiques notamment le N,N-diéthyl-4-nitroaniline et le 4-nitroaniline (Mora-Pale *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du paramètre  $\beta$  dans la prédiction de solubilisation de la cellulose dans le LI ; plus la valeur de  $\beta$  est élevée ( $> 0,8$ ) plus le LI est capable de solubiliser efficacement la cellulose. De plus, le paramètre  $\beta$  semblerait être plus influencé par l'anion, puisque pour le même cation,  $\beta$  varie en variant l'anion constitutif (Fukaya *et al.*, 2008 ; Doherty *et al.*, 2010). Par exemple, les deux LI hydrophiles sélectionnés dans notre étude, le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate présentent une valeur de  $\beta$  de 0,95 (Zhang *et al.*, 2012) et de 1,00 (Fukaya *et al.*, 2008), respectivement. Ces deux LI solubilisent efficacement la cellulose (Husson *et al.*, 2011; Auxenfans *et al.*, 2012). En revanche, le 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim][PF<sub>6</sub>]) et le 1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate ([Bmim][BF<sub>4</sub>]) ne solubilisent pas la cellulose (Swatloski *et al.*, 2002), conformément à leur faible valeur de  $\beta$ , respectivement de 0,21 et 0,38 (Crowhurst *et al.*, 2003).

Toutefois, le paramètre  $\beta$  ne suffit pas à lui seul à prédire l'amplitude de la solubilisation de la cellulose étant donné que pour une valeur de  $\beta$  similaire, le type de l'anion, sa taille ainsi que sa structure sembleraient exercer également un rôle important (Fukaya *et al.*, 2008 ; Brandt *et al.*, 2013).

Le rôle du cation dans la solubilisation de la cellulose dans les LI a fait l'objet de nombreuses études contradictoires. En effet, des analyses RMN ont attribué la dissolution de la cellulose dans le 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure ([Bmim][Cl]) principalement aux interactions entre l'ion chlorure et la cellulose (Rensing *et al.*, 2006). Cependant, d'autres études suggèrent que l'anion et le cation sont tous les deux importants pour la solubilisation de la cellulose. Cho *et al.* (2011) ont trouvé que lors de la solubilisation de la cellulose dans le [Bmim][Cl], le cation semblerait aussi interagir avec la cellulose. Ainsi, l'anion et le cation seraient tous deux impliqués dans les interactions avec les résidus de glucose ; la solubilisation de la cellulose est attribuée à leur action couplée (Cho *et al.*, 2011). De plus, des analyses RMN réalisées sur le cellobiose modèle et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] ont indiqué que des liaisons hydrogènes s'établissent entre les hydroxyles de la cellulose et à la fois l'anion et le cation du LI (Zhang *et al.*, 2010). De même, les études de la solubilisation de la cellulose dans le 1-allyl-3-méthylimidazolium chlorure [Amim][Cl] ainsi que dans le 1-butyl-3-méthylimidazolium formate [Bmim][OFm] ont montré que

l'anion et le cation forment tous les deux des liaisons hydrogène avec les hydroxyles de la cellulose (Zhang *et al.*, 2005 ; Medronho and Lindman, 2014).

Par conséquent, le mécanisme de solubilisation de la cellulose dans le LI peut être décrit comme suit (**Figure I.14**). La solubilisation est induite par la formation de complexes accepteurs d'électrons/donneurs d'électrons entre les oxygènes des hydroxyles de cellulose et les protons aromatiques des cations constitutifs des LI, d'une part, et entre les hydrogènes de la cellulose et les anions constitutifs des LI, d'autre part (Zhu *et al.*, 2006 ; Medronho and Lindman, 2014). Par ailleurs, des simulations de dynamique moléculaire réalisées sur des oligomères de cellulose en présence de [Emim][OAc] ont mis en évidence des interactions hydrophobes entre le cation et la cellulose (Liu *et al.*, 2010a) (**Figure I.14**).

Enfin, il est important d'indiquer que l'origine de la cellulose ainsi que son degré de polymérisation (DP) pourraient impacter le mécanisme de solubilisation de celle-ci dans le LI, plus le DP est élevé plus le taux de solubilisation de la cellulose diminue (Wahlström and Suurnäkki, 2015). En outre, la présence d'impuretés dans le LI, particulièrement l'eau, pourrait affecter considérablement la solubilité de la cellulose (Swatloski *et al.*, 2002 ; Shill *et al.*, 2011). Dans ce contexte, il a été démontré que l'addition de 20% (m/m) d'eau empêcherait la dissolution de la cellulose dans le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate (Gericke *et al.*, 2011) alors que la présence de 1% (m/m) d'eau rendrait la cellulose insoluble dans le 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure (Swatloski *et al.*, 2002). Une hypothèse explicative serait que l'eau établirait, d'une manière compétitive, des liaisons hydrogènes avec l'anion du LI réduisant ainsi les interactions entre l'anion et la cellulose (Shill *et al.*, 2011 ; Hauru *et al.*, 2012). La présence d'eau est un paramètre délicat à contrôler puisque l'humidité peut parvenir de l'air (les LI sont hygroscopiques) et la cellulose elle-même contient généralement de l'eau (Wahlström and Suurnäkki, 2015).

### 3.2.3. Solubilisation de la BLC dans les LI

Le principe de solubilisation de la BLC est similaire à celui détaillé pour la cellulose étant donné que la BLC est majoritairement constituée de polysaccharides. En plus de la cellulose, les hémicelluloses, les lignines et les extractibles interagissent avec le LI.

En 2007, le 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure fut le premier LI rapporté pour sa solubilisation du bois (Fort *et al.*, 2007). Ensuite, les travaux de Sun *et al.* (2009) mirent en évidence la solubilisation du bois dans le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate.

Les LI peuvent établir différents types de liaisons avec la BLC incluant des interactions de dispersion ( $\pi$ - $\pi$ ), des liaisons hydrogènes, des interactions ioniques ainsi que des interactions hydrophobes et de Van der Waals (Anderson *et al.*, 2002 ; Zavrel *et al.*, 2009). Ces interactions variées pourraient être à l'origine de la capacité de certains LI à solubiliser la BLC. Outre les liaisons hydrogènes entre le LI (anion et cation) et la lignocellulose qui déstructureraient l'architecture tridimensionnelle de la BLC, les interactions hydrophobes/  $\pi$ - $\pi$  entre le cation et les noyaux aromatiques des lignines exerceraient un rôle dans leur solubilisation (Kilpeläinen *et al.*, 2007 ; Zavrel *et al.*, 2009 ; Shill *et al.*, 2011 ; Wahlström and Suurnäkki, 2015).

Similairement à ce qui est décrit pour la cellulose, la solubilisation de la BLC dans les LI semblerait étroitement corrélée aux paramètres de Kamlet-Taft (Doherty *et al.*, 2010 ; Mora-Pale *et al.*, 2011). Particulièrement, il a été rapporté que le paramètre  $\beta$  semblerait déterminer la capacité d'un LI à déstructurer le réseau de liaisons hydrogènes entre les lignines et les polysaccharides d'une part, et entre les chaînes de la cellulose cristalline d'autre part (Kilpeläinen *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2009). De plus, il est considéré que la solubilisation de la BLC dans un LI serait intimement dépendante de plusieurs facteurs, entre autres, la nature du LI (avec toutefois un rôle important de l'anion constitutif), le type de BLC (les herbacées étant plus facilement solubilisées que les substrats d'origine forestière) et les conditions réactionnelles (charge en substrat, ratio substrat/LI, durée et température) (Sun *et al.*, 2009). De même, la taille des particules est un paramètre clé à considérer, plus elles sont fines, plus la solubilisation de la BLC est améliorée (Sun *et al.*, 2009 ; Mora-Pale *et al.*, 2011).

#### 3.2.4. Régénération de la (ligno)cellulose solubilisée et effet du prétraitement

La solubilisation de la cellulose ou de la BLC est suivie par une étape de régénération consistant à ajouter au mélange LI – substrat, un anti-solvant polaire. Ceci permettra la précipitation d'une fraction solide enrichie en cellulose et de la séparer de la fraction liquide correspondant au mélange LI & anti-solvant. La biomasse régénérée peut être récupérée par filtration ou centrifugation et lavée intensivement à

l'eau afin d'éliminer au mieux le LI résiduel (Dadi *et al.*, 2006 ; Shill *et al.*, 2011). Toutefois, des études de prétraitement de la cellulose ont conclu que le pourcentage de récupération de la cellulose après régénération pourrait dépasser 100%, suggérant qu'un pourcentage de LI allant de 0,1 à 10% (m/m) resterait piégé dans la cellulose prétraitée (Husson *et al.*, 2011 ; Xia *et al.*, 2014). La présence du LI résiduel représente un facteur délicat à prendre en compte afin de prévenir la désactivation des enzymes par des concentrations élevées en LI (Zhao *et al.*, 2009 ; Hong *et al.*, 2012) mais également les microorganismes de fermentation (Sitepu *et al.*, 2014 ; Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018).

La précipitation de la cellulose solubilisée peut être réalisée efficacement par l'ajout de solvants polaires protiques, tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone ou une combinaison de ces solvants (Zhao *et al.*, 2009). L'effet de la régénération de la cellulose pourrait être expliqué par l'extraction sélective des ions du LI dans la phase aqueuse à travers les liaisons hydrogènes, les interactions dipolaires et les forces de Coulomb (Crosthwaite *et al.*, 2005 ; Zavrel *et al.*, 2009). Afin d'expliquer le mécanisme de précipitation de la cellulose, Zavrel *et al.* (2009) ont suggéré que les molécules de l'anti-solvant entourent les ions du LI entraînant la rupture de leurs interactions avec la (ligno)cellulose. Par conséquent, les liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires se forment à nouveau au sein de la cellulose, ce qui conduit à sa précipitation.

Les premières études sur l'utilisation des LI pour le prétraitement de la cellulose ont été rapportées par Dadi *et al.* (2006) et Dadi *et al.* (2007) qui ont solubilisé puis régénéré la cellulose microcristalline dans le 1-n-butyl-3-méthylimidazolium chlorure ([Bmim][Cl]) et puis dans le 1-allyl-3-méthylimidazolium chlorure ([Amim][Cl]). Ces études ont montré que la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose prétraitée aux LI était 90 fois plus élevée que celle de la cellulose non prétraitée, ce qui est attribué à la transition de la cellulose cristalline I à la cellulose amorphe II (Dadi *et al.*, 2007). Après prétraitement aux LI, la cellulose présente un affaiblissement dans sa cristallinité et/ou une perturbation de son organisation des fibres (Kilpelainen *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2009 ; Husson *et al.*, 2011). En revanche, il a été constaté que la fraction enrichie en cellulose récupérée après prétraitement avait un DP et une polydispersité similaires à la cellulose initiale, mais des différences significatives des macro- et micro- structures ont été remarquées (Zhu, 2008). L'accès à la cellulose est

ainsi facilité, par l'augmentation de la surface spécifique, ce qui permet d'améliorer l'efficacité de l'hydrolyse (Zavrel *et al.*, 2009).

Concernant la BLC, les autres constituants que la cellulose (hémicelluloses et lignines) pourraient être également solubilisés à des pourcentages variables selon la nature du LI, le type de BLC et également les conditions réactionnelles, particulièrement la température et la durée du prétraitement. Des températures élevées et/ou des temps de prétraitement longs entraînent une solubilisation des lignines et des hémicelluloses plus importante dans le LI. Toutefois, il est remarqué que la fraction cellulosique est majoritairement récupérée après prétraitement aux LI et régénération de la BLC (Miyafuji *et al.*, 2009 ; Arora *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2011). Les LI peuvent être ainsi considérés comme des solvants permettant la solubilisation de la BLC mais également sa déconstruction et le fractionnement de ses constituants.

D'une manière générale, l'effet du prétraitement sur les propriétés du substrat dépend à la fois du type de substrat, de la nature du LI et des conditions du prétraitement. Les principaux effets du prétraitement aux LI peuvent être catégorisés en (1) décristallisation ou transformation de la cellulose I à la cellulose II, (2) extraction des lignines et des hémicelluloses et (3) réduction partielle du degré de polymérisation de la cellulose (Wahlström and Suurnäkki, 2015).

Des études ont montré par exemple que l'utilisation du 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] améliorerait considérablement l'hydrolyse de la cellulose de différents types de BLC (cultures dédiées, co-produits forestiers) sans nécessiter beaucoup d'énergie (Li *et al.*, 2010 ; Auxenfans *et al.*, 2014b). La pureté de la cellulose ainsi que ses propriétés physiques ont été trouvées comparables à celles de la cellulose pure ayant subi le même prétraitement (Mora-Pale *et al.*, 2011).

L'utilisation des LI paraît prometteuse aussi bien en terme de prétraitement de la BLC qu'en terme de fractionnement. Cependant, il existe encore de nombreux défis à relever pour mettre cette méthode en pratique à l'échelle industrielle. D'une part, le coût des LI employés à ce jour pour les prétraitements reste relativement élevé, ce qui est un obstacle important pour le développement de ce procédé à l'échelle industrielle. Le coût actuel des LI pourrait cependant diminuer avec le développement de leur utilisation dans de nombreuses applications.

Par ailleurs, pour diminuer le coût du prétraitement, des études ont été effectuées sur la recyclabilité ou plutôt la réutilisation des LI. Suivant les conditions de prétraitement et la nature de la biomasse, il a été montré que l'[Emim][OAc] pouvait être recyclé au moins 5 fois sans perte, ou avec faible perte, de rendement en glucose obtenu après hydrolyse enzymatique. La diminution d'efficacité qui se produit ensuite est probablement due à l'altération structurale des LI lors du prétraitement et à l'accumulation de lignine dans le liquide (Auxenfans *et al.*, 2012 ; Weerachanchai and Lee, 2014). Afin de réduire le coût du prétraitement, d'autres LI, moins chers, sont également en cours de développement. Par exemple, le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] a été étudié dans ce contexte et constitue un candidat potentiel pour le prétraitement de la biomasse en raison de son coût moins élevé. A ce jour, avec un degré de pureté supérieur à 98% pour nos études fondamentales, un litre d'[Emim][OAc] coûte 800 euros (hors taxes) alors qu'un litre d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] est à 450 euros (hors taxes) chez Solvionic SA, France.

Une autre façon de réduire les coûts du prétraitement serait de valoriser les autres constituants de la lignocellulose, et principalement la lignine, qui peut être utilisée dans de nombreuses applications, ce qui est en accord avec le concept de la bioraffinerie. Après le prétraitement, une partie de la lignine se retrouve solubilisée dans le LI avec l'hémicellulose. Extraire cette lignine permettrait non seulement de la valoriser mais également de purifier le LI afin d'améliorer sa réutilisation. Dans une autre étude sur les BLC d'oléagineux, ces deux LI, l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ont été mis en œuvre dans l'eau subcritique, permettant de conserver l'avantage de l'effet du LI mais réduisant leur teneur à 10% dans l'eau (Husson *et al.*, 2018).

### 3.2.5. Effet de la température

Certains auteurs distinguent l'utilisation de LI à haute ou basse température en accordant le terme « prétraitement » par le LI lorsqu'il s'agit d'une température supérieure à 80°C et « activation » par le LI quand la température est inférieure à 80°C.

Le terme de prétraitement a été initialement introduit par comparaison avec la voie biochimique de production du bioéthanol de première génération pour lequel les enzymes agissent directement sur la matière première pour libérer les

monosaccharides, ce qui est inefficace sur la BLC sans une première étape de déconstruction de cette BLC.

Ces auteurs suggèrent que la réalisation de prétraitement aux LI à haute température pourrait conduire à une dégradation et une élimination de la lignine et de l'hémicellulose alors qu'une faible température permettrait la récupération de polymères constitutifs de la lignocellulose avec une meilleure intégrité en réduisant leur dégradation (Labbé *et al.*, 2012 ; Parthasarathi *et al.*, 2016 ; Moyer *et al.*, 2018). L'étape d'activation par le LI permettrait de réduire l'enchevêtrement entre les polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) et les lignines entraînant une amélioration des rendements de l'hydrolyse enzymatique (Singh *et al.*, 2009 ; Labbé *et al.*, 2012). Les lignines peuvent ainsi être récupérées dans la fraction solide du substrat régénéré (Moyer *et al.*, 2018). Pourtant, le terme prétraitement par le LI est le plus souvent employé dans la littérature même pour les basses températures (Auxenfans *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2014b ; Scullin *et al.*, 2015 ; Vasheghani Farahani *et al.*, 2016).

De par sa capacité à solubiliser efficacement la cellulose, le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] a été largement décrit à la fois pour le prétraitement et l'activation de la (ligno)cellulose, induisant des changements de cristallinité de cellulose même s'il s'agit d'activation (Labbé *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2014b ; Vasheghani Farahani *et al.*, 2016 ; Mehmood *et al.*, 2018 ; Moyer *et al.*, 2018). Cependant, il a été rapporté que le prétraitement à l'[Emim][OAc] pourrait entraîner une acétylation indésirable de la cellulose étroitement liée aux conditions de température et/ou durée du prétraitement (Köhler *et al.*, 2007 ; Vasheghani Farahani *et al.*, 2016). L'acétylation semblerait augmenter pour des températures plus élevées et également pour des temps d'incubation plus longs (Köhler *et al.*, 2007 ; Karatzos *et al.*, 2012 ; Vasheghani Farahani *et al.*, 2016). En effet, Vasheghani Farahani *et al.* (2016) ont comparé l'effet du prétraitement de la cellulose modèle (Avicel) par l'[Emim][OAc] (pureté  $\geq 97\%$ ) pendant 3 h à 50°C ou à 140°C, par des études de résonance magnétique nucléaire (RMN). Ils ont trouvé que le spectre de la cellulose incubée dans l'[Emim][OAc] à 140°C montre un changement chimique (apparition d'un pic à  $\sim 170,6$  ppm, correspondant au carbone C-7 de la fonction carbonyle de cellulose acétylée), alors que ce changement est absent sur le spectre de la cellulose incubée dans l'[Emim][OAc] à 40°C ou celui de la cellulose non prétraitée. Vasheghani

Farahani *et al.* (2016) suggèrent que l'incubation de la cellulose dans l'[Emim][OAc] à basse température (50°C) réduit l'acétylation de la cellulose par l'[Emim][OAc] par rapport aux températures élevées (140°C). Ce qui indique que le prétraitement de la cellulose à basses températures mérite d'être envisagé. De plus, la durée d'incubation de la cellulose dans l'[Emim][OAc] semble influencer le degré d'acétylation (ou de substitution) de celle-ci. Alors que Vasheghani Farahani *et al.* (2016), ont estimé que le degré de substitution est de 0,15 (15%) pour la cellulose incubée dans l'[Emim][OAc] pendant 4 h à 140°C, Karatzos *et al.* (2012) ont rapporté un degré de substitution de 0,017 (1,7%) pour la cellulose (Avicel) prétraitée à l'[Emim][OAc] (pureté ≥ 97%) pendant 20 min à 150°C. Ceci montre que l'incubation de la cellulose dans l'[Emim][OAc] à des températures élevées pendant de longues durées peut augmenter l'acétylation de la cellulose (Vasheghani Farahani *et al.*, 2016).

L'acétylation de la cellulose pourrait produire des résidus de glucose acétylés indésirables et diminuer les rendements d'hydrolyse enzymatique (Dongowski, 2001 ; Gille and Pauly, 2012). Vasheghani Farahani *et al.* (2016) ont évalué l'effet d'acétylation sur l'hydrolyse enzymatique (par les cellulases commerciales Cellic CTec2) de la cellulose régénérée après prétraitement à l'[Emim][OAc] pendant 4 h à 50 ou 140°C. Ils ont trouvé que les rendements en glucose obtenus sont plus élevés (~100%) dans le cas du prétraitement à 50°C (absence d'acétylation de la cellulose) en comparaison avec la cellulose prétraitée à 140°C (71%) où le degré d'acétylation est estimé à 15% (Vasheghani Farahani *et al.*, 2016).

De plus, l'acétylation indésirable de la cellulose pourrait conduire à la perte des groupements acétate constitutifs du LI ce qui résulte en une réduction de l'efficacité de sa réutilisation et de sa compatibilité aux processus industriels (Vasheghani Farahani *et al.*, 2016).

### 3.2.6. Liquides ioniques et enzymes

En 1984, la première étude sur l'utilisation d'une enzyme (la phosphatase alcaline) dans un milieu aqueux en présence de éthylammonium nitrate [EtNH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>] fut rapportée par Magnuson *et al.* (1984).

Au cours de la dernière décennie, l'étude de l'activité des enzymes en milieux non conventionnels (en présence de LI) a fait l'objet de nombreuses recherches fondamentales et appliquées (Gorke *et al.*, 2010 ; Moniruzzaman *et al.*, 2010 ;

Naushad *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2013 ; Wahlström and Suurnäkki, 2015 ; Sivapragasam *et al.*, 2016). Le comportement des enzymes, en milieu non conventionnel (en présence des LI) dépend de l'enzyme, de son origine, du type de réaction catalysée et du type du LI, c'est pourquoi il semble difficile de généraliser l'effet des LI sur l'activité des enzymes. Certaines enzymes montrent une activité catalytique dans les LI alors que d'autres deviennent inactives. La polarité, la nature du cation, la longueur de la chaîne alkyle, l'anion, l'hydrophobicité et la viscosité du LI sont des facteurs pouvant affecter la performance des enzymes dans les LI (Geng *et al.*, 2010 ; Sivapragasam *et al.*, 2016). Plus particulièrement, l'anion constitutif du LI impacte la stabilité et l'activité des enzymes en raison de ses propriétés nucléophiles (Naushad *et al.*, 2012). En effet, les anions présentant une forte capacité d'accepteur de liaison hydrogène pourraient interagir fortement avec les enzymes entraînant un changement de leur conformation (Sivapragasam *et al.*, 2016). Par exemple, les travaux de Noritomi *et al.* (2011) ont mis en évidence le rôle de l'anion du LI sur l'activité du lysozyme ; l'enzyme montrait une activité significativement plus faible en présence du 1-éthyl-3-méthylimidazolium chlorure [Emim][Cl] qu'en présence du 1-éthyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate [Emim][BF<sub>4</sub>] et du 1-éthyl-3-méthylimidazolium trifluorométhanesulfonate [Emim][NTf<sub>2</sub>]. Comme règle de base, il est considéré que les anions dont la charge négative est répartie sur plusieurs atomes (trifluorométhanesulfonate, hexafluorophosphate, tétrafluoroborate, méthylphosphonate) sont plus stabilisants que ceux portant la charge négative sur un seul atome (halogénure, acétate) (Gorke *et al.*, 2010 ; Sivapragasam *et al.*, 2016).

Les lipases sont les enzymes les plus décrites comme étant actives dans certains LI, avec même une amélioration de leur activité en comparaison avec les solvants organiques conventionnels comme le 2-méthyl-2-butanol, l'acide acétique, le chloroforme, l'hexane ou l'acide trifluoroacétique (Kragl *et al.*, 2002 ; Husson *et al.*, 2008). Une explication possible serait que les LI induisaient une augmentation de l'énantiosélectivité et la régiosélectivité des enzymes (Yang and Pan, 2005 ; Gorke *et al.*, 2010).

Cependant, la présence de LI résiduel semblerait impacter négativement l'hydrolyse enzymatique de la cellulose en désactivant les cellulases. A titre d'exemple, la présence de faibles concentrations (10% v/v) du 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] ou 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure [Bmim][Cl], connus pour

solubiliser efficacement la cellulose, provoque une diminution sévère de l'activité des cellulases (perte de 85% d'activité) (Engel *et al.*, 2010). Toutefois, les cellulases incubées en présence de 10% de 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure [Bmim][Cl] présentent à nouveau une activité catalytique après dilution du milieu réactionnel (Salvador *et al.*, 2010), mettant en évidence une désactivation réversible des cellulases dans ce LI (Turner *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il semblerait qu'en fonction de l'anion du LI, les effets sur l'hydrolyse enzymatique soient plus ou moins importants. Dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], il a été montré que le rendement en glucose était maximal pour une concentration en LI de 10% (Auxenfans *et al.*, 2012). Au-delà de cette concentration, une désactivation des cellulases se produit. A des concentrations élevées en [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], l'inactivation des cellulases pourrait être la conséquence de l'établissement de liaisons hydrogènes avec l'anion constitutif du LI. En revanche, l'amélioration des rendements d'hydrolyse en présence de 10% de ce LI est suggérée comme due à un compromis entre une meilleure accessibilité à la cellulose vue sa dissolution partielle et une inactivation minimisée des enzymes (Kamiya *et al.*, 2008 ; Jones and Vasudevan, 2010 ; Auxenfans *et al.*, 2017). Ainsi, selon la nature de l'anion constitutif du LI et en fonction de la concentration du LI, la présence de ce dernier pourrait contribuer à une augmentation de l'activité enzymatique controversant l'effet néfaste souvent attribué aux LI.

L'activité des cellulases notamment celles de *Aspergillus niger* et de *Trichoderma reesei* en milieu non conventionnel, a été largement rapportée dans la littérature mais rarement dans le cas des xylanases. Dans ce contexte, Sadaf *et al.* (2016) ont étudié l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé prétraitée par l'[Emim][OAc] en utilisant les xylanases sécrétées par le champignon thermophile, *Sporotrichum thermophile*. Les xylanases présentaient une activité et une meilleure stabilité en présence de concentrations élevées d'[Emim][OAc] jusqu'à 50% (v/v) (Sadaf *et al.*, 2016). Cependant, l'activité des xylanases en milieu non conventionnel, comme pour toute autre enzyme, dépend, entre autres, de l'espèce dont elles proviennent. En effet, Jaeger and Pfaendtner (2013) ont étudié par simulations de dynamique moléculaire, l'effet de différentes concentrations de 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] et de 1-éthyl-3-méthyl-imidazolium éthyl sulfate [Emim][EtSO<sub>4</sub>] sur les xylanases commerciales de *Trichoderma longibrachiatum*. La présence de ces deux

LI, même à des faibles concentrations, entraînait une atténuation drastique du mouvement dynamique des xylanases. De plus, les cations du LI sont piégés dans le site catalytique des enzymes, ce qui leur permet de se comporter en tant qu'inhibiteur compétitif du substrat. Suite à ces observations, la perte de l'activité enzymatique pourrait être due à l'inhibition des enzymes par les LI, particulièrement par les cations et à l'affaiblissement de la dynamique des xylanases (Jaeger and Pfaendtner, 2013).

## 4. Production de bioéthanol 2G par voie fermentaire

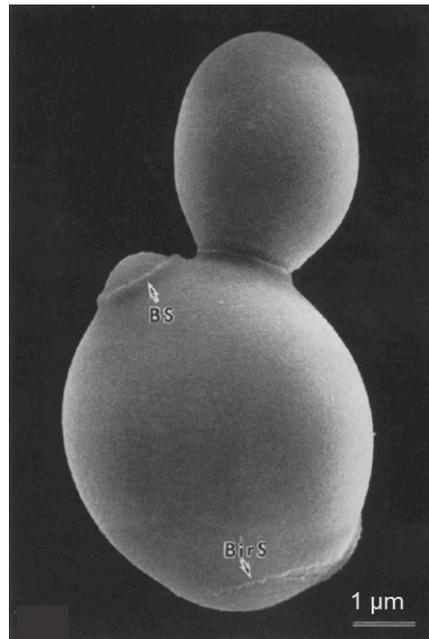
Les hydrolysats enzymatiques de la fraction cellulosique et hémicellulosique contiennent à la fois des hexoses (glucose, galactose et mannose) et des pentoses (xylose et arabinose) qui peuvent être convertis en bioéthanol 2G (Keshwani and Cheng, 2009). Divers microorganismes peuvent accomplir le processus de fermentation éthanolique tels que les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus*, ou les bactéries comme *Escherichia coli* et *Zymomonas mobilis*. Cependant, *S. cerevisiae* reste la souche de fermentation principale (Olofsson et al., 2008b ; Limayem and Ricke, 2012).

Les levures, notamment *S. cerevisiae*, occupent une place privilégiée au niveau industriel dans divers domaines. Elles sont largement utilisées pour la production de boissons alcoolisées (vin, bière...) et aliments fermentés (pain, fromage...) ainsi qu'en tant qu'usine cellulaire pour la production de molécules pharmaceutiques (antibiotiques, protéines...). De nos jours, la levure *S. cerevisiae* est également largement utilisée pour la production de bioéthanol à l'échelle industrielle.

Dans ce travail de thèse, quatre espèces de levures ont été sélectionnées pour l'étape de fermentation éthanolique : *S. cerevisiae* YSC2 Type II, *K. marxianus* UMIP 2234.94, *Scheffersomyces shehatae* CLIB 1339 (anciennement *Candida shehatae*) et *Scheffersomyces stipitis* CLIB 187 (anciennement *Pichia stipitis*).

### 4.1. Caractéristiques et morphologie des levures

La levure est un champignon unicellulaire faisant partie du règne des Fungi dont la taille des cellules varie largement et peut être comprise entre 2 – 3 µm et 20 – 50 µm en longueur et 1 – 10 µm en largeur (Walker and White, 2017). Les cellules de *S. cerevisiae* sont ovoïdes (**Figure I.15**) et leurs dimensions vont de 5 à 10 µm de long et 5 µm environ de large (Walker and White, 2017).

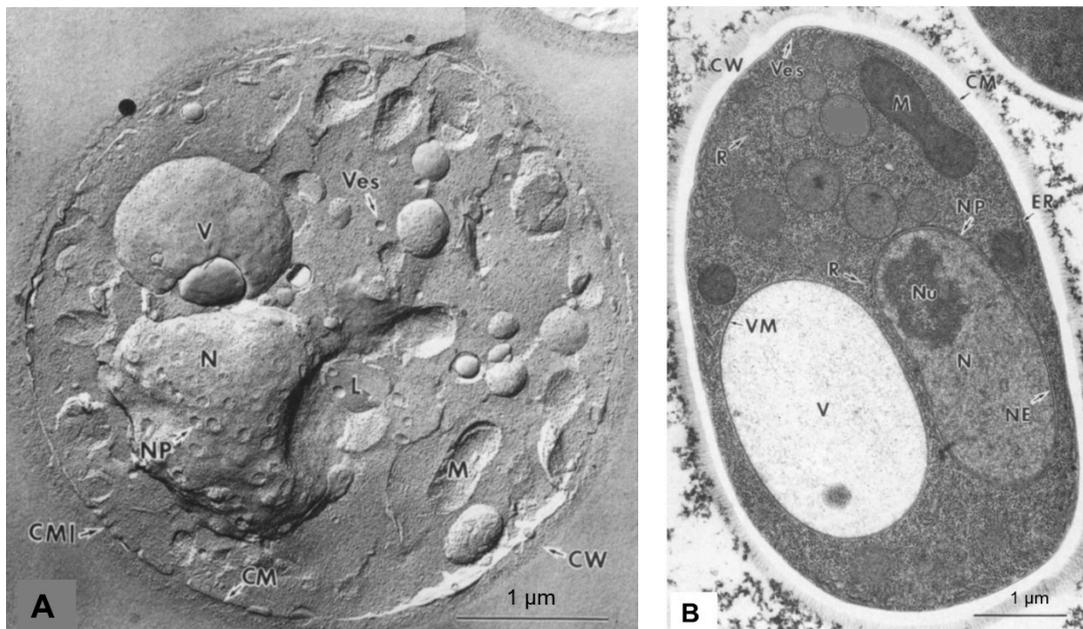


**Figure I.15.** Image de *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB), BS : bud scar (cicatrice du bourgeon) et BirS : birth scar (cicatrice de naissance) (Osumi, 1998)

D'autres formes caractéristiques de levures peuvent être distinguées : cylindrique (*Schizosaccharomyces*), sphérique (*Debaryomyces*), incurvée (*Cryptococcus*), ainsi que certaines formes spécifiques comme triangulaire (*Trigonopsis*), apiculée (*Hanseniaspora*), en bouteille (*Pityrosporum*) ou ogivale (*Dekkera*, *Brettanomyces*) (Walker and White, 2017). Des formes intermédiaires entre levures et champignons filamenteux, marquant le phénomène de dimorphisme cellulaire, ont également été décrites chez certaines espèces telles que *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* et *Yarrowia lipolytica*. Plusieurs facteurs externes comme la température, le pH ou la teneur en glucose peuvent provoquer cette transition levure – mycélium (Vidotto *et al.*, 1988). Il existe une grande diversité au niveau de la morphologie des levures ainsi que dans le mode de reproduction cellulaire (Walker and White, 2017). La reproduction asexuée ou végétative est la plus fréquente et se fait soit par bourgeonnement soit par fission. Cependant, certaines levures et dans des conditions déterminées présentent, lors de leur cycle biologique, une reproduction sexuée où on note une alternance entre haploïdie et diploïdie.

## 4.2. Structure cellulaire des levures

La structure cellulaire de la levure est de type eucaryote renfermant un cytoplasme entouré d'une membrane plasmique et contenant entre autres, une vacuole, un appareil de sécrétion (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, vésicules de sécrétion), un noyau délimité par une membrane nucléaire et des mitochondries. Une paroi cellulaire entoure la membrane plasmique des levures (Osumi, 1998) (**Figure I.16**). Outre la paroi cellulaire, la capsule, un organe externe supplémentaire peut être rencontré chez certaines levures (Walker and White, 2017).

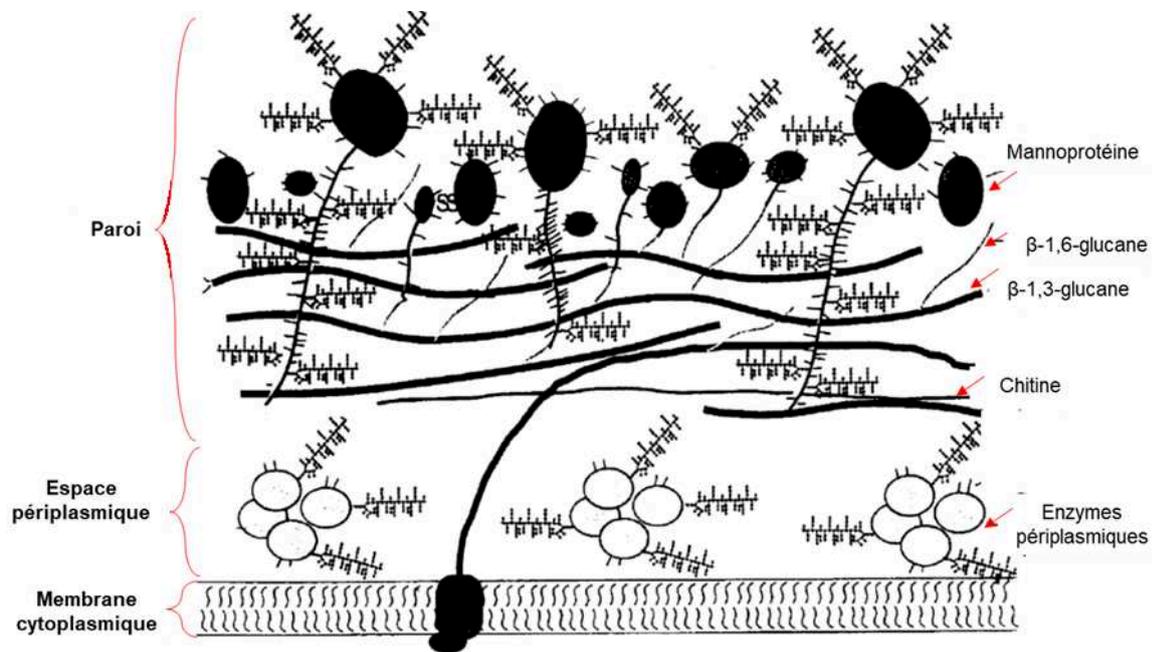


**Figure I.16.** Images de *Saccharomyces cerevisiae* (A) et de *Candida tropicalis* (B) obtenues par microscopie électronique en transmission (MET), CW : cell wall (paroi cellulaire), CM : cytoplasmic membrane (membrane cytoplasmique), CMI : cytoplasmic membrane invagination (invaginations de la membrane cytoplasmique), V : vacuole, VM : vacuole membrane, N : noyau, Nu : nucléole, NE : nuclear envelope (enveloppe nucléaire), NP : nuclear pores (pores nucléaires), M : mitochondrie, Ves : vésicules, R : ribosomes, ER : endoplasmic reticulum (réticulum endoplasmique) (Osumi, 1998)

### 4.2.1. Paroi cellulaire

La paroi des levures est une structure dynamique conférant à la cellule un support mécanique rigide face à la pression osmotique imposée par l'environnement, tout en restant élastique pour permettre la croissance et la division cellulaire. Cette paroi épaisse est impliquée dans l'adhésion entre cellules voisines et peut déclencher

les voies de transduction de signal à l'intérieur des cellules. Structuellement, la paroi cellulaire des levures diffère de la paroi cellulaire végétale pectocellulosique. Trois principaux groupes de polysaccharides constituent la paroi des levures : polymères de mannose (mannanes et mannoprotéines) hydrosolubles, polymères de glucose alcalinosolubles et alcalinoinsolubles ( $\beta$ -1,3-glucane majoritairement et  $\beta$ -1,6-glucane dans une quantité moindre) et polymères de N-acétylglucosamine (chitine) relativement minoritaires par rapport aux deux autres polysaccharides (**Figure I.17**) (Nguyen *et al.*, 1998 ; Klis *et al.*, 2002 ; Aguilar-Uscanga and François, 2003 ; Bowman and Free, 2006).



**Figure I.17.** Représentation schématique de la structure de l'enveloppe cellulaire de la levure *S. cerevisiae* (d'après Walker, 1998 et Walker and White, 2017)

Les proportions de ces polysaccharides sont très variables selon les espèces (**Tableau I.5**). D'une manière générale, la composition de la paroi cellulaire des levures dépend des espèces, des conditions de cultures et du cycle cellulaire (Aguilar-Uscanga and François, 2003 ; Bowman and Free, 2006). Il est démontré que des perturbations dans la structure de la paroi affectent profondément la croissance et la forme des levures entraînant des lésions ou des morts cellulaires (Bowman and Free, 2006).

**Tableau I.5.** Proportions (en %) des polysaccharides de la paroi cellulaire de certaines souches de levures (Nguyen *et al.*, 1998)

Espèce de levure	Glucanes alcalinosolubles (%)	Glucanes alcalinoinsolubles (%)	Chitine	Manno-protéines
<i>K. marxianus</i> R157	10,0 ± 4,2	40,6 ± 5,4	4,1 ± 0,4	34,1 ± 4,1
<i>K. marxianus</i> 1586	48,0 ± 3,1	18,5 ± 1,2	1,1 ± 0,1	25,6 ± 3,5
<i>S. cerevisiae</i> 1117	33,5 ± 4,1	37,3 ± 3,0	3,4 ± 0,3	24,4 ± 3,5

#### 4.2.2. Espace périplasmique

Le périplasme ou l'espace périplasmique se situe entre la membrane plasmique et la couche interne de la paroi où sont localisées des mannoprotéines et des enzymes (comme par exemple, des invertases et des acides phosphatase) ne pouvant pas traverser la paroi (Barnett and Robinow, 2002 ; Arnold, 2018) (**Figure I.17**).

#### 4.2.3. Membrane cytoplasmique et cytoplasme

La membrane cytoplasmique des levures est une bicouche de phospholipides traversée par des protéines globulaires, contrôlant l'apport des nutriments et l'excrétion des métabolites. L'ergostérol représente le principal stérol trouvé dans la membrane des levures, par opposition au cholestérol et au phytostérol trouvés dans les membranes des animaux et des plantes, respectivement (Walker and White, 2017).

Le cytoplasme sous-jacent renferme des organites cellulaires tels que les mitochondries, les vacuoles, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, le cytosquelette, des ribosomes, des protéasomes. Il contient également des lipides, des polysaccharides, des polyphosphates et des enzymes dont celles de la glycolyse et de la fermentation alcoolique (Walker and White, 2017).

Les mitochondries contiennent des ADN, ARN, ARN polymérase et des protéines de la chaîne respiratoire à laquelle sont associées des cytochromes C. Elle constitue le site du métabolisme respiratoire en aérobie et celui des acides gras, des

acides aminés et des stérols en conditions anaérobies et aérobie (Walker and White, 2017).

#### 4.2.4. Noyau

Le noyau est l'organite cellulaire qui définit la nature eucaryote des cellules des levures. Les levures possèdent un seul noyau entouré par une enveloppe à double membrane avec la plus externe étant en relation continue avec le réticulum endoplasmique. Le noyau contient le génome de la levure qui est réparti sur des chromosomes (enroulement d'ADN couplé à des protéines, les histones) renfermés dans un nucléoplasme. La plupart des levures sont haploïdes (une seule copie de chaque chromosome) mais certaines (par exemple *S. cerevisiae*) peuvent alterner entre haploïdie et diploïdie et même polyploïdie (Herskowitz, 1988 ; Walker and White, 2017).

Le nombre de chromosomes varie selon l'espèce de levure pouvant atteindre 16 chromosomes chez *S. cerevisiae*. Le génome de cette dernière renfermant environ 6000 gènes, représente le premier génome eucaryote qui a été complètement séquencé en utilisant la technique de séquençage standard de Sanger (Goffeau *et al.*, 1996). Depuis, d'autres levures telles que *K. marxianus* (Inokuma *et al.*, 2015) et *S. stipitis* (Jeffries *et al.*, 2007 ; Jeffries and Van Vleet, 2009) ont été séquencées par des technologies de séquençage de nouvelle génération (Riley *et al.*, 2016).

### 4.3. Les exigences nutritionnelles

Outre les conditions de température et de pH adéquates, les levures requièrent pour leur croissance une source énergétique carbonée et d'autres composés tels que, par ordre d'importance décroissant, l'azote minéral ou organique, le phosphore et le soufre et d'autres minéraux et de vitamines. Les substances nécessaires à la croissance des levures se répartissent entre macronutriments et micronutriments (**Tableau I.6**).

**Tableau I.6.** Éléments essentiels requis pour la croissance et le fonctionnement des cellules des levures (d'après Walker and White, 2017)

<b>Élément</b>	<b>Sources</b>	<b>Fonctions cellulaires</b>
<b>Carbone</b>	Sucres (principalement monosaccharides ou disaccharides)	Élément structural en combinaison avec O, H et N ; source d'énergie
<b>Oxygène</b>	Air, O <sub>2</sub>	Oxydant de la chaîne respiratoire et autres réactions enzymatiques oxydatives ; essentiel à la biosynthèse de l'ergostérol et des acides gras insaturés
<b>Azote</b>	Sels d'ammonium, urée, acides aminés, peptone, extrait de levure	Composant des protéines, des acides nucléiques et de chitine
<b>Phosphore</b>	Phosphates	Acides nucléiques, phospholipides membranaires, transduction d'énergie
<b>Soufre</b>	Sulfates, méthionine	Acides aminés soufrés, et vitamines
<b>Hydrogène</b>	Hydrates de carbone, protons de l'environnement acide	Force proton-motrice nécessaire pour la nutrition ; Régulation du pH intracellulaire nécessaire au métabolisme
<b>Potassium</b>	Sels de potassium	Equilibre ionique, activité enzymatique
<b>Magnésium</b>	Sels de magnésium	Activité enzymatique et structure des organites
<b>Calcium</b>	Sels de calcium	Transduction du signal
<b>Cuivre</b>	Sels de cuivres	Oxydant
<b>Fer</b>	Sels de fer	Cytochromes, protéine hémiques
<b>Manganèse</b>	Sels de manganèse	Activité enzymatique
<b>Zinc</b>	Sels de zinc	Activité enzymatique
<b>Nickel</b>	Sels de nickel	Activité enzymatique (uréase)
<b>Molybdène</b>	Sels de molybdène	Métabolisme de nitrate, vitamine B12

Les macronutriments, requis à des concentrations de l'ordre du milli-molaire (0,1 à 1 mM) comprennent des sources de carbone, d'azote, d'oxygène, de phosphore, de potassium et de magnésium, servant comme éléments de structure des levures ainsi que comme source d'énergie. Les micronutriments sont indispensables en très faibles concentrations (de l'ordre de micro-molaire) principalement en tant que cofacteurs aux

enzymes. Ils regroupent des oligoéléments tels que le calcium, le cuivre, le fer, le manganèse et le zinc, certains acides aminés que la levure est incapable de synthétiser et des facteurs de croissance (thiamine, biotine, acide pantothénique) (Walker and White, 2017).

Les substrats carbonés fournissent le carbone nécessaire pour la biosynthèse de constituants cellulaires et l'énergie indispensable à la croissance et au fonctionnement des levures et sont ainsi d'une grande importance pour les levures. Ensuite vient l'azote qui est un élément indispensable à la synthèse de nombreuses molécules et composants cellulaires comme les acides aminés qui sont à la base des protéines et les nucléotides à base des acides nucléiques (ADN et ARN) et également le N-acétylglucosamine, précurseurs de la chitine. L'azote utilisable par les levures peut être apporté par des sources minérales sous forme de sels d'ammonium (phosphate, sulfate ou chlorure) ou également par des composés organiques tels que les acides aminés, les peptides, les peptones (hydrolysats de protéines) et les extraits de levure. Ces derniers semblent être la source d'azote la plus performante car en plus des acides aminés, ils apportent des vitamines et des minéraux (Walker and White, 2017).

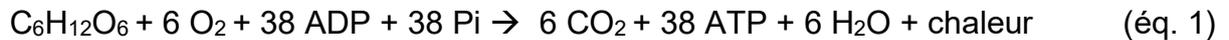
#### **4.4. Métabolisme**

Le métabolisme carboné central comprend la glycolyse, le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique, la phosphorylation oxydative, la voie des pentoses phosphates et la voie fermentaire (fermentation éthanolique). Ces nombreuses voies sont le plus souvent interconnectées : le produit de l'un étant le réactif de l'autre, ce qui rend le fonctionnement du métabolisme très complexe. Le métabolisme de la levure est orienté par le substrat carboné, les conditions de culture et la disponibilité de l'oxygène pour être oxydatif, fermentaire ou oxydo-réductif (Flores *et al.*, 2000).

##### **4.4.1. Métabolisme oxydatif**

Ce métabolisme permet l'oxydation complète du glucose (ou de la source carbonée assimilable) en dioxyde de carbone et en énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) avec un rendement cellulaire important. Il s'agit ainsi du métabolisme produisant le plus d'énergie et permettant une multiplication efficace des cellules (par bourgeonnement). Trois voies principales sont impliquées dans ce métabolisme, à savoir, la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. La présence de l'oxygène (avec une quantité élevée) et la concentration en glucose

(ou en substrat carboné) sont deux paramètres clés qui contrôlent ce métabolisme. Le bilan énergétique théorique de l'oxydation complète du glucose, lors de cette voie métabolique, est représenté par l'équation suivante, s'il est considéré que tous les coenzymes d'oxydoréduction servent à produire de l'ATP au cours du métabolisme respiratoire :



#### *4.4.1.1. La glycolyse*

La glycolyse, aussi appelée la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, est la première phase de dégradation des sucres chez la levure. La glycolyse s'effectue dans le cytoplasme de la cellule et comprend deux phases. La première phase consiste en la conversion du glucose en fructose 1,6-biphosphate impliquant 3 réactions enzymatiques de phosphorylation, isomérisation puis une seconde phosphorylation. Le fructose 1,6-biphosphate est ensuite dégradé en deux unités tricarbonées phosphorylées interconvertibles (**Figure I.18**). Lors de la deuxième phase, l'oxydation de ces unités tricarbonées permet la formation de 2 molécules de pyruvates, 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH+H<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide réduite) (Van Dijken and Scheffers, 1986 ; Bakker *et al.*, 2001 ; Dickinson, 2004 ; Bai *et al.*, 2008).

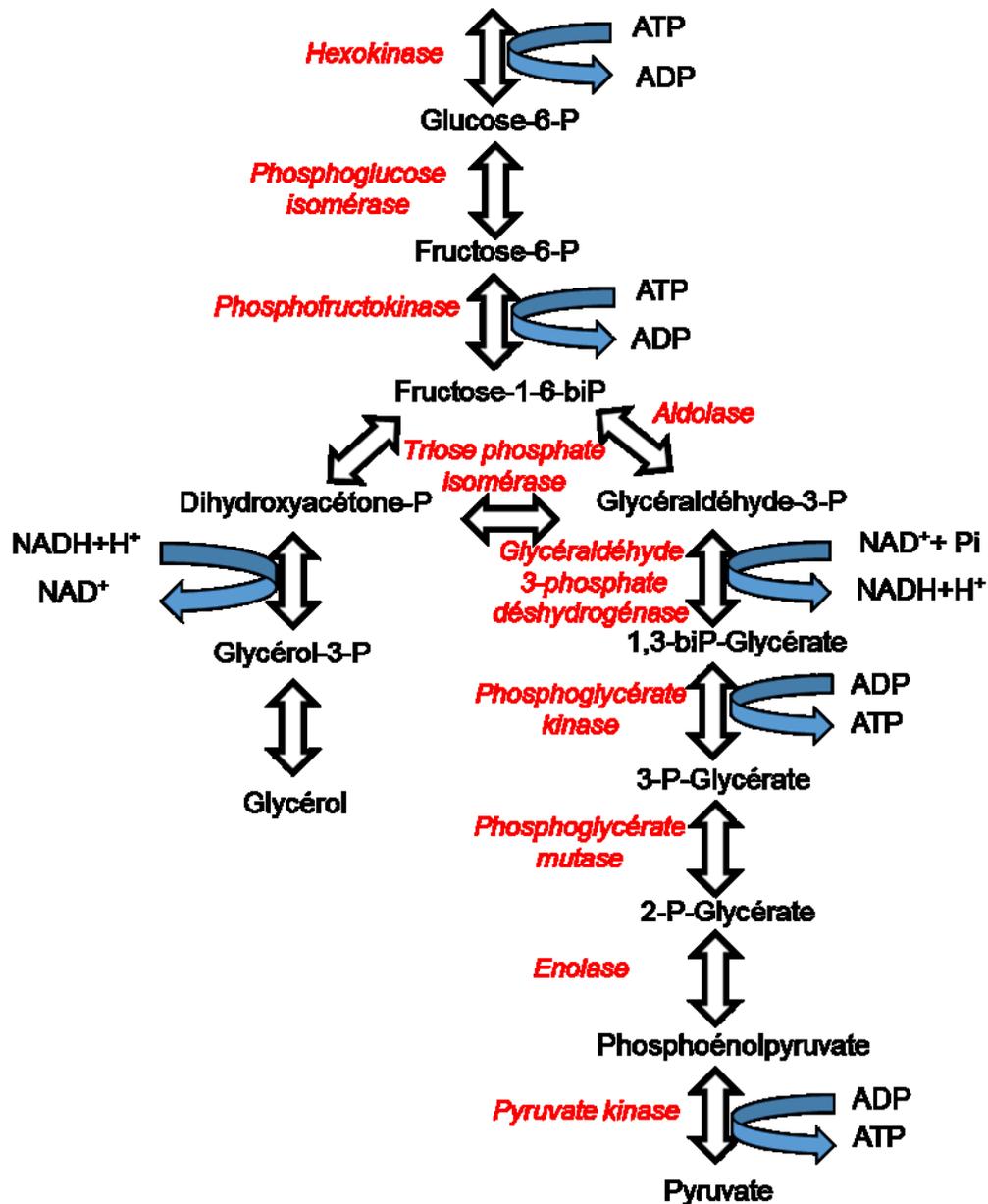


Figure I.18. Voie métabolique de la glycolyse (d'après Bai et al., 2008)

La réoxydation de ces coenzymes (NADH+H<sup>+</sup>) ou en d'autres termes la régénération du NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide oxydée) est nécessaire afin de maintenir l'équilibre rédox et donc la poursuite de la glycolyse. Durant le métabolisme respiratoire aérobie, la réoxydation du NADH formé au cours de la glycolyse s'effectue via la chaîne respiratoire mitochondriale, produisant une molécule d'ATP supplémentaire. Le pyruvate est alors métabolisé oxydativement en acétyl coenzyme A puis en dioxyde de carbone et eau via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire de transport d'électrons, au niveau de la mitochondrie, avec le dioxygène (O<sub>2</sub>) étant l'accepteur final d'électrons (Pronk et al., 1996 ; Bakker et al., 2001).

L'énergie produite sous forme de gradient membranaire de protons est utilisée pour produire de l'ATP.

#### 4.4.1.2. Le nœud métabolique du pyruvate

La dégradation du glucose en pyruvate via la glycolyse représente l'étape commune du catabolisme des sucres chez les levures. En revanche, la destinée du pyruvate est variable et dépend de la levure considérée, des conditions de culture, notamment la disponibilité en oxygène, mais aussi du sucre de départ. Deux réactions de transformation de pyruvate sont ainsi possibles chez les levures comme le montre la **Figure I.19** ; soit il est converti en éthanol (fermentation) via l'acétaldéhyde, soit il est oxydé en acétyl coenzyme A (acétyl CoA) puis en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) via le cycle de Krebs (Bakker *et al.*, 2001 ; Lei *et al.*, 2001).

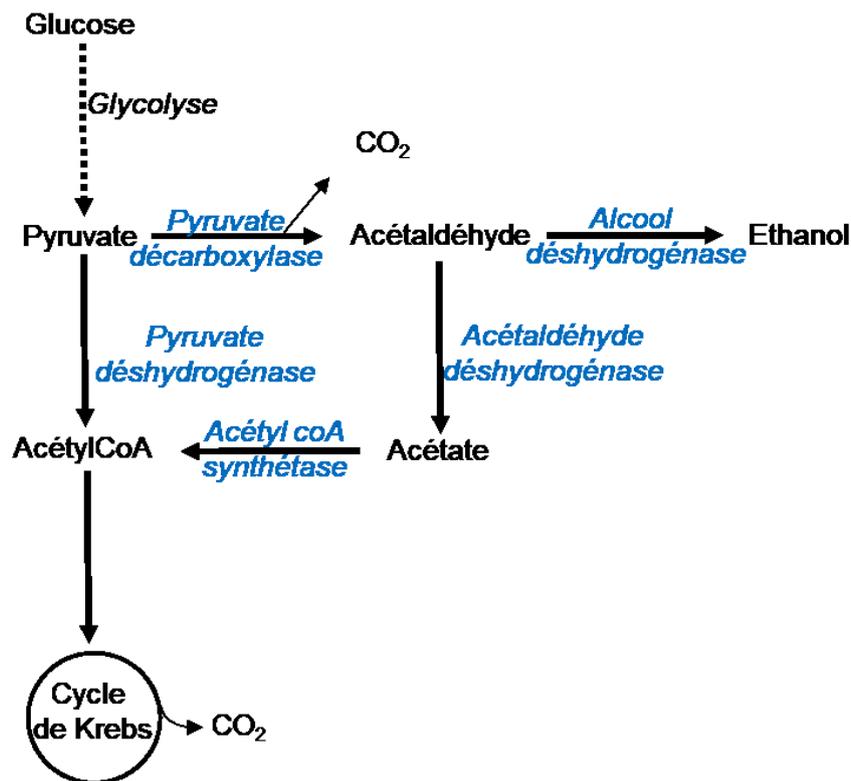


Figure I.19. Nœud métabolique du pyruvate (d'après Lei *et al.*, 2001)

Chez la levure *S. cerevisiae*, le métabolisme du glucose et ensuite l'assimilation du produit majoritaire de la fermentation de ce dernier : l'éthanol, peut être expliqué au niveau génétique par l'induction et la répression de certains gènes impliqués dans ces

voies. En effet, les alcools déshydrogénases (ADH) sont des enzymes jouant un rôle indispensable dans la fermentation ethanologique avec la pyruvate décarboxylase : le pyruvate résultant de la glycolyse est converti en acétaldéhyde puis en éthanol. Il a été rapporté que 7 gènes codant pour les ADH sont présents chez la levure *S. cerevisiae*. Les gènes *adh1* et *adh2* sont notamment les plus impliqués dans la production de l'éthanol ou sa dégradation. Le gène *adh1* code pour l'enzyme fermentaire responsable de la conversion de l'acétaldéhyde en éthanol, exprimée en présence d'un excès du glucose. En revanche, le gène *adh2*, susceptible d'être réprimé par le glucose code pour l'isoenzyme qui convertit l'éthanol en acétaldéhyde et permet ainsi aux cellules d'utiliser l'éthanol comme source de carbone (Bennetzen and Hall, 1982).

4.4.1.3. Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative

En aérobiose, le pyruvate est transporté dans les mitochondries où il est décarboxylé oxydativement en acétyl CoA par la pyruvate déshydrogénase selon la réaction suivante :



Cette réaction irréversible représente le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique ou encore cycle des acides tricarboxyliques. Le cycle de Krebs est considéré comme une source de précurseurs pour la synthèse de diverses molécules telles que les acides aminés, l'ergostérol et les bases nucléotidiques. Le cycle de Krebs consiste en une série de réactions d'oxydation-réduction aboutissant à l'oxydation du groupe acétyle (la source d'énergie carbonée) en deux molécules de dioxyde de carbone et à la réduction de FAD (flavine adénine dinucléotide) en FADH<sub>2</sub> et de NAD<sup>+</sup> en NADH+H<sup>+</sup> (Figure I.20).

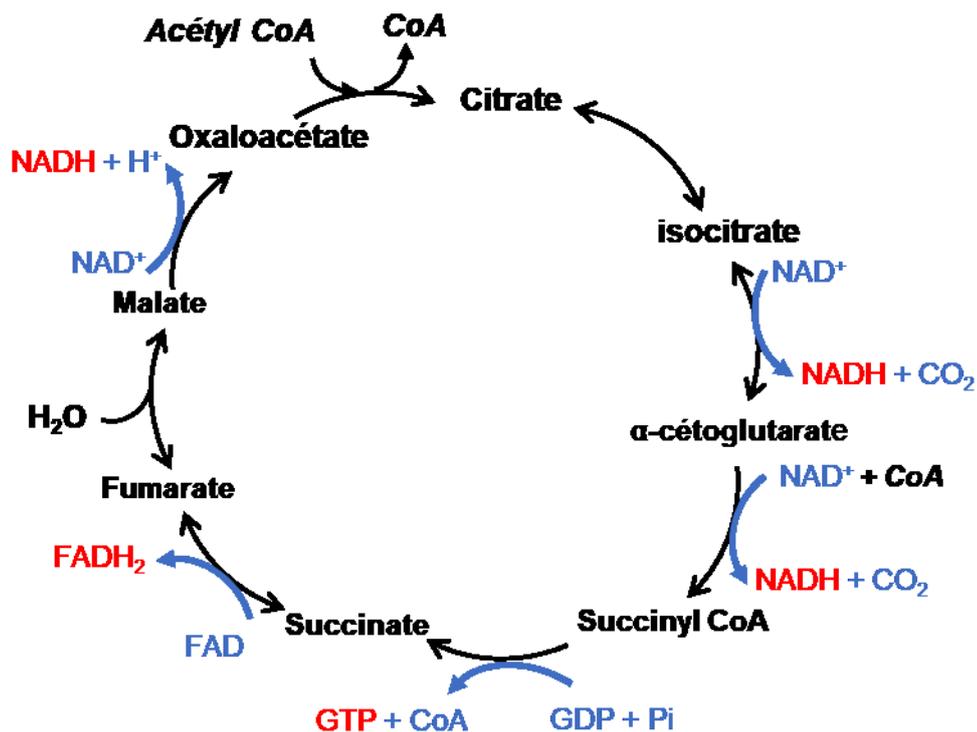


Figure I.20. Le cycle de Krebs (Pi : phosphate inorganique) (D'après Flores *et al.*, 2000)

Le cycle de Krebs génère ainsi des électrons de haute énergie qui serviront pour la synthèse d'ATP. Chaque cycle génère un  $\text{FADH}_2$  et trois  $\text{NADH}+\text{H}^+$ ; ces transporteurs d'électrons seront oxydés par l'oxygène qui est l'accepteur final des électrons lors de la phosphorylation oxydative. Au sein de la membrane mitochondriale interne, les électrons libérés par oxydation de  $\text{FADH}_2$  et  $\text{NADH}+\text{H}^+$  passent à travers la chaîne de transporteurs d'électrons (protéines membranaires comme les cytochromes) entraînant un gradient de protons (ou force protonmotrice transmembranaire) qui est utilisé pour produire de l'ATP par l'ATP synthase (Flores *et al.*, 2000).

#### *4.4.1.4. La voie des pentoses phosphates*

La voie des pentoses phosphates, illustrée en **Figure I.21**, représente une source cruciale de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui est indispensable pour les réactions de biosynthèse réductrice chez les levures (Osmond and Ap Rees, 1969). Le glucose 6-phosphate sert pour l'entrée dans la voie de glycolyse mais également dans la voie des pentoses phosphates. Tout dépend des besoins cellulaires des levures en énergie (sous forme d'ATP) ou en précurseurs biosynthétiques et en pouvoir réducteur. Le ribose 5-phosphate, un intermédiaire formé lors de la voie des pentoses phosphates, et ses dérivés rentrent dans la constitution des acides nucléiques (ADN et ARN), ainsi que de l'ATP, du NADH, du FAD et du coenzyme A (Wood, 1986). La voie des pentoses phosphates est inhibée par des fortes concentrations en NADPH et par les intermédiaires de synthèse des acides gras, alors que la glycolyse est limitée par l'énergie métabolique élevée.

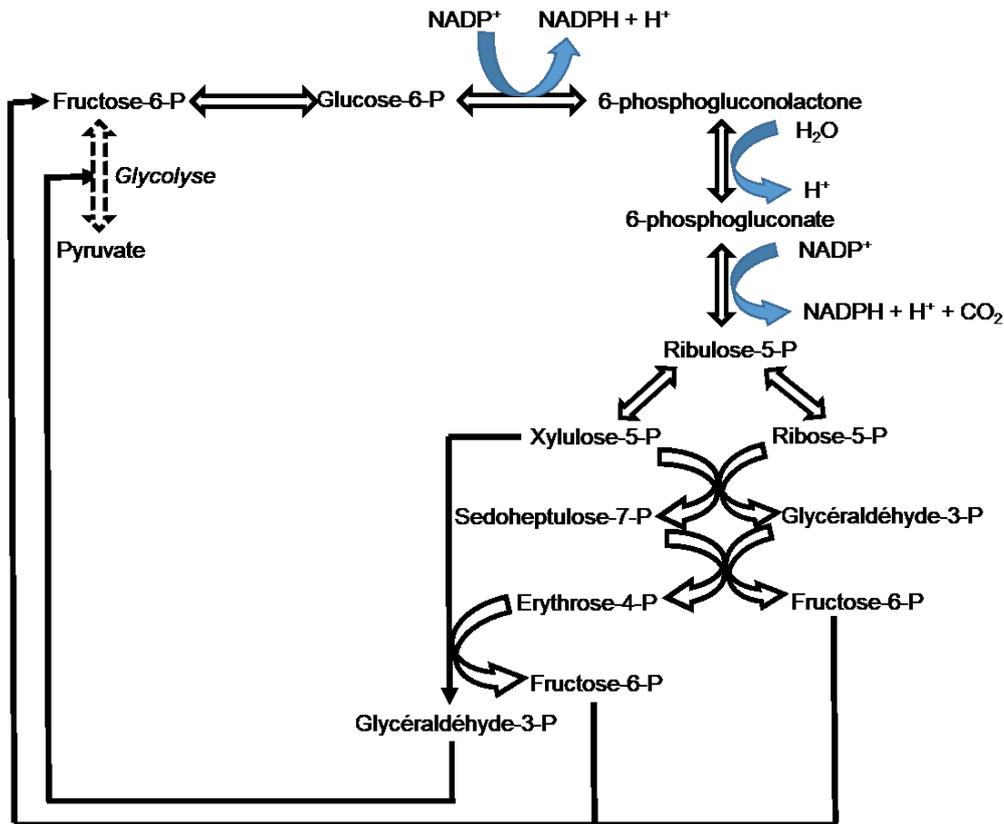
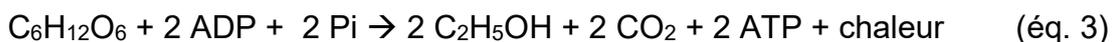


Figure I.21. La voie des pentoses phosphates (d'après Slekar *et al.*, 1996)

#### 4.4.2. Métabolisme fermentaire

Le métabolisme fermentaire des levures permet la conversion du glucose en éthanol et en dioxyde de carbone avec coproduction de certains acides et esters ainsi que de glycérol. La glycolyse, convertissant une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH, est la voie commune aux deux métabolismes respiratoire et fermentaire. Etant privée de son accepteur final d'électrons ( $O_2$ ), la cellule convertit le pyruvate en acétaldéhyde dont la réduction en éthanol et  $CO_2$  permettra de réoxyder le NADH formé lors de la glycolyse. Ainsi, le métabolisme fermentaire génère de l'ATP en proportions plus faibles que le métabolisme respiratoire et l'équation bilan de la fermentation du glucose en éthanol est la suivante :



#### 4.4.3. Métabolisme oxydo-réductif – effet Crabtree

L'effet Crabtree décrit les phénomènes par lesquels en conditions aérobies, le métabolisme fermentaire prédomine sur le métabolisme oxydatif en présence de

concentrations élevées en glucose. Certaines levures, telles que *S. cerevisiae*, sont sensibles aux fortes concentrations en glucose qui font basculer le métabolisme oxydatif vers un métabolisme fermentaire. Ces levures sont définies comme étant Crabtree-positives. A des concentrations élevées en glucose, la levure *S. cerevisiae* convertit le glucose en éthanol, même en aérobiose, plutôt qu'en biomasse cellulaire via le cycle de Krebs. Cependant, les levures *K. marxianus*, *S. shehatae* et *S. stipitis* sont, elles, Crabtree-négatives (Van Dijken and Scheffers, 1986 ; Fonseca *et al.*, 2008 ; Al-mhanna, 2010).

Plusieurs hypothèses expliquent l'effet Crabtree. Il est supposé que l'augmentation de la concentration du glucose accélère le flux glycolytique qui génère ainsi un nombre suffisant d'ATP. Cela réduit la nécessité de la phosphorylation oxydative couplée au cycle de Krebs via la chaîne de transporteurs d'électrons, diminuant ainsi la consommation d'oxygène (Al-mhanna, 2010). Par ailleurs, l'inhibition de la respiration par le glucose, observée chez certaines levures Crabtree-positives, semble être due à l'inhibition par le glucose, de la synthèse des enzymes du métabolisme respiratoire et/ou à leur désactivation (van den Brink, 2009).

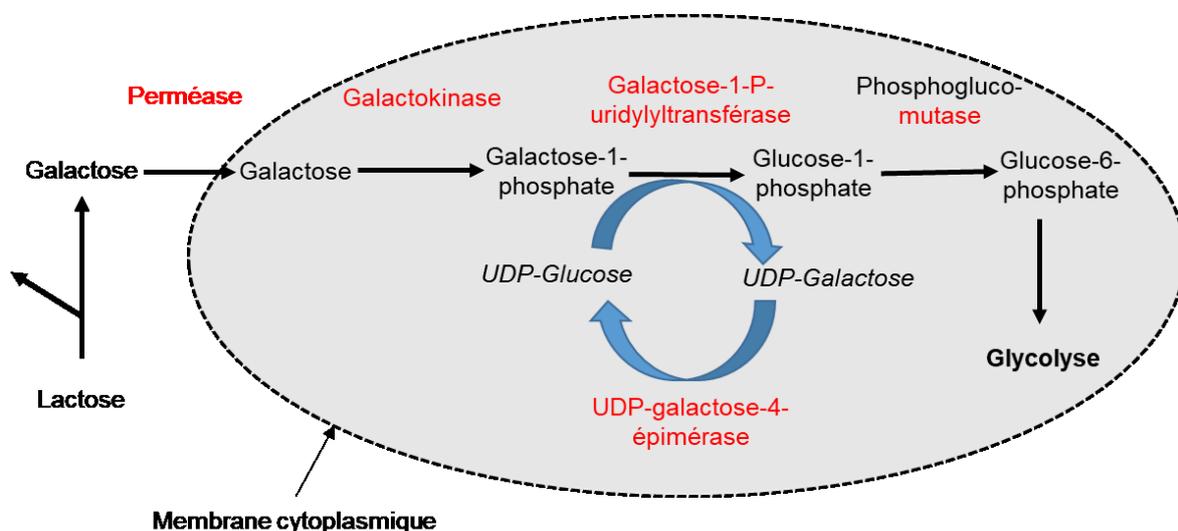
Une autre interprétation de cette transition métabolique réside dans le phénomène de flux de carbone au niveau du nœud métabolique du pyruvate et de l'acétyladéhyde ainsi qu'aux caractéristiques des enzymes impliquées dans son métabolisme (**Figure I.19**). En effet, la pyruvate déshydrogénase a une meilleure affinité pour le pyruvate que la pyruvate décarboxylase, mais sa vitesse maximale est plus faible. Pour un flux glycolytique élevé, dépassant un seuil critique, la pyruvate déshydrogénase est saturée, déplaçant la réaction dans le sens de formation de l'acétaldéhyde plutôt que de l'acétyl CoA (et donc le cycle de Krebs). De même, l'acétaldéhyde est préférentiellement transformé en acide acétique mais lorsque l'acétaldéhyde déshydrogénase est saturée, l'acétaldéhyde serait converti en éthanol (Lei *et al.*, 2001). Cette répression de la respiration ou plutôt l'apparition de l'éthanol en aérobiose s'effectue à différentes concentrations en glucose selon l'espèce de levure. Par exemple, pour *S. cerevisiae* une concentration de glucose entre 0,1 et 1 g/L suffit pour qu'il y ait production d'éthanol (Ratledge, 1991).

Chez les levures Crabtree-négatives, en conditions aérobies le glucose même à des concentrations élevées, est métabolisé principalement par voie oxydative (métabolisme respiratoire) alors que sa conversion en éthanol (métabolisme

fermentaire) s'effectue en conditions anaérobies ou limitées en oxygène (Alexander *et al.*, 1988 ; Flores *et al.*, 2000).

#### 4.4.4. Métabolisme des hexoses

Le contrôle et la régulation du transport de divers solutés dont les sucres s'effectuent au niveau de la membrane cytoplasmique de la cellule. Ainsi, le transport des sucres à travers la membrane cellulaire constitue la première étape de leur métabolisme à l'exception de certains cas où un disaccharide ou un trisaccharide est hydrolysé à l'extérieur de la cellule. Le transport des sucres s'effectue à travers des transporteurs spécifiques, parfois appelés perméases. Il a été démontré que la famille des transporteurs du glucose caractérisée chez la levure *S. cerevisiae* soit fortement régulée, notamment au niveau de la transcription des gènes codant pour ces transporteurs, par la concentration du glucose dans le milieu (Özcan and Johnston, 1999). Le transport des monosaccharides tels que le glucose, le mannose et le fructose s'effectue par diffusion facilitée chez de nombreuses levures (Flores *et al.*, 2000). Les hexoses intracellulaires engagent la glycolyse après une étape de phosphorylation. Le glucose, le fructose et le mannose sont phosphorylés par une hexokinase alors qu'une galactokinase assure la phosphorylation du galactose. Toutefois, la machinerie enzymatique de phosphorylation des hexoses peut varier entre différentes levures. Le catabolisme du galactose est initié par la voie de Leloir qui consiste en une série de réactions convertissant le galactose en glucose-6-phosphate qui s'engagera dans la glycolyse, comme le montre la **Figure I.22** (Caputto *et al.*, 1949 ; Pannala *et al.*, 2010).



**Figure I.22.** Voie de Leloir (métabolisme du galactose, ou du lactose : disaccharide formé d'une unité de galactose liée en  $\beta$ -1,4 à une unité de glucose). UDP-glucose : uridine diphosphate glucose, UDP-galactose : uridine diphosphate galactose (d'après Timson, 2007 et Pannala *et al.*, 2010)

Le catabolisme de ces monosaccharides démarre par la glycolyse, convertissant ces hexoses en pyruvate. La destinée du pyruvate, comme discuté précédemment, dépend du métabolisme de la levure (respiratoire, fermentaire ou respiro-fermentaire) qui varie selon l'espèce et les conditions de culture de la levure.

Toutefois, le glucose est supposé exercer un effet répressur sur le catabolisme des autres sources de carbone assimilables (Smolke, 2009). Le glucose et également le fructose se distinguent des autres sucres comme étant la source de carbone préférée de la cellule (Gancedo, 1998). Il a été constaté, principalement chez *S. cerevisiae*, que la présence du glucose avec d'autres sucres dans le milieu tels que le galactose, le mannose ou le maltose induit une répression des gènes codant pour les enzymes nécessaires à leur assimilation par la levure (Johnston, 1999). Ceci souligne l'effet dominant du glucose sur les autres sources de carbone, on parle de l'effet glucose ou « répression catabolique » par le glucose (Magasanik, 1961).

#### 4.4.5. Métabolisme des disaccharides

Le métabolisme des disaccharides est précédé par une hydrolyse enzymatique libérant leurs monomères. Dépendamment de l'espèce de levure et la nature du sucre, cette hydrolyse s'effectue soit à l'extérieur de la membrane cellulaire, dans l'espace périplasmique, soit à l'intérieur de la cellule après l'import du disaccharide.

Le saccharose est constitué d'une unité de glucose liée en  $\beta$ -1,2 à une unité de fructose. Dans la plupart des cas, son hydrolyse est effectuée par une invertase ( $\beta$ -D-fructofuranosidase) localisée dans l'espace périplasmique dont l'expression est régulée par la concentration du glucose (Carlson and Botstein, 1982 ; Özcan *et al.*, 1997 ; Flores *et al.*, 2000). Cependant, une forme cytoplasmique de l'invertase a également été rapportée chez certaines levures telles que *S. cerevisiae* et *Candida albicans* (Stambuk *et al.*, 1999 ; Flores *et al.*, 2000). L'hydrolyse enzymatique intracellulaire du saccharose nécessite son transport actif via une protéine transmembranaire (symport  $H^+$ ) (Stambuk *et al.*, 1999).

Le maltose, un autre disaccharide constitué de deux unités de glucose liées par une liaison glucosidique  $\alpha$ -1,4, est hydrolysé à l'intérieur de la cellule par l' $\alpha$ -glucosidase. Le maltose est transporté vers le milieu intracellulaire via un transport actif impliquant un symport  $H^+$ . Il a été rapporté que l'expression du gène codant pour l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase est inductible par le maltose ou le saccharose mais réprimée par le glucose (Williamson *et al.*, 1993 ; Van den Broek *et al.*, 1997).

Le lactose, formé à partir d'une unité de galactose liée en  $\beta$ -1,4 à une unité de glucose, n'est pas assimilé par la levure *S. cerevisiae* qui ne consomme pas non plus le cellobiose, dimère de glucose liés en  $\beta$ -1,4 (Yoon *et al.*, 2003). A contrario, la levure *Kluyveromyces lactis* assure l'hydrolyse intracellulaire du lactose par une  $\beta$ -galactosidase après son transport actif (Dickson and Barr, 1983 ; Das *et al.*, 1985). Alors que le cellobiose n'est pas consommé par *S. cerevisiae*, des souches de *S. shehatae* (CSIR-Y492) et *S. stipitis* (CSIR-Y633) ont été décrites comme capables de consommer ce disaccharide avec une production d'éthanol observée uniquement chez *S. stipitis* (Du Preez *et al.*, 1986).

#### 4.4.6. Métabolisme des pentoses

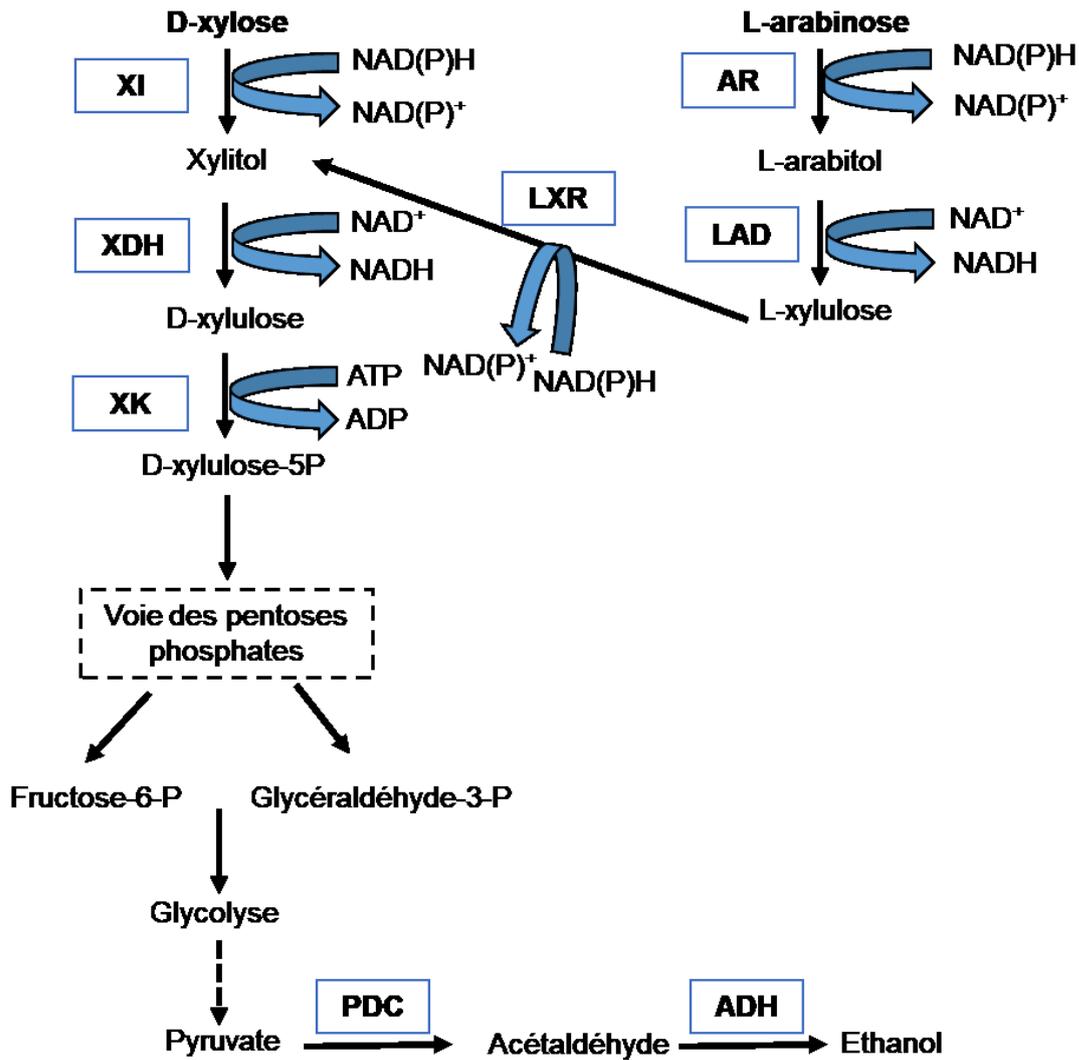
Le D-xylose et L-arabinose sont les deux aldopentoses principaux issus de la fraction hémicellulosique de la BLC, bien que le L-arabinose soit moins abondant (Keshwani and Cheng, 2009 ; Gírio *et al.*, 2010). Vu la quantité considérable de D-xylose présent dans l'hémicellulose et son potentiel en tant que substrat pour la production d'éthanol à partir de la biomasse, de nombreuses études ont été effectuées sur la fermentation de ce sucre par les levures (Jeffries, 1983 ; Kurtzman, 1983 ; Schneider *et al.*, 1983 ; Rouhollah *et al.*, 2007 ; Antunes *et al.*, 2014).

La levure modèle de fermentation des hexoses *S. cerevisiae* est décrite comme étant incapable de fermenter les pentoses (Bai *et al.*, 2008 ; Gírio *et al.*, 2010), mais peut fermenter le xylulose (Dellomonaco *et al.*, 2010 ; Balat, 2011). Bien qu'ils ne soient pas métabolisés par les souches sauvages de *S. cerevisiae*, le D-xylose et le L-arabinose sont transportés à l'intérieur des cellules par des transporteurs non spécifiques d'hexoses, ayant une affinité vis-à-vis du xylose environ 200 fois inférieure à celle du D-glucose (Katahira *et al.*, 2006).

La levure modèle thermotolérante *K. marxianus* est décrite capable de fermenter les hexoses. Cependant, les études concernant sa capacité à assimiler et à fermenter

les pentoses, notamment le xylose, sont très contradictoires. Certains auteurs ont décrit une production d'éthanol par *K. marxianus* sous conditions aérobies (Margaritis and Bajpai, 1982), alors que d'autres ont rapporté une fermentation de ce pentose sous conditions limitées en oxygène (Delgenes *et al.*, 1986). En revanche, il existe d'autres études qui précisent que *K. marxianus* ne fermente pas le xylose quelle que soit la condition (Stambuk *et al.*, 2003 ; Ballesteros *et al.*, 2004). Ainsi, la fermentation du xylose par la levure *K. marxianus* peut être considérée comme souche-dépendante, certaines souches sont capables de le faire alors que d'autres non (Rouhollah *et al.*, 2007).

Cependant, d'autres levures telles que *S. stipitis*, *S. shehatae*, *Pachysolen tannophilus* ou *Candida parapsilosis* ont été rapportées comme les souches les plus efficaces pour la fermentation de D-xylose (Du Preez and van der Walt, 1983). Le transport du xylose s'effectue principalement par diffusion facilitée à travers la membrane bien que certaines levures montrent un transport actif de celui-ci. Toutefois, le transport du xylose semblerait fortement lié aux transporteurs du glucose (Lucas and van Uden, 1986 ; Fonseca *et al.*, 2007). Pour le L-arabinose, son transport peut s'effectuer via la diffusion facilitée ou par transport actif transmembranaire (symport H<sup>+</sup>) mais requiert des transporteurs très spécifiques à l'arabinose, différents de ceux du xylose (Lucas and van Uden, 1986 ; Fonseca *et al.*, 2007). L'utilisation de ces deux pentoses nécessite leur conversion en D-xylulose qui après phosphorylation rejoint la voie des pentoses phosphates (Katahira *et al.*, 2006) (**Figure I.23**).



**Figure I.23.** Schéma représentant le dégradation du D-xylose et L-arabinose chez les levures. XR : D-xylose réductase, XDH : xylose déshydrogénase, XK : xylulose kinase, AR : L-arabinose réductase, LAD : L-arabitol 4-déshydrogénase, LXR : L-xylulose réductase, PDC : pyruvate décarboxylase, ADH : alcool déshydrogénase (d'après Gírio *et al.*, 2010)

La conversion du xylose en D-xylulose s'effectue via l'action des deux enzymes : la xylose réductase (XR) (EC 1.1.1.21) qui convertit le D-xylose en xylitol et la xylitol déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.9) qui convertit le xylitol en D-xylulose.

Par ailleurs, en conditions anaérobies ou limités en oxygène, une accumulation du xylitol à partir du xylose pourrait être observée, ce qui est probablement dû à un déséquilibre du pouvoir rédox. L'accumulation du xylitol serait expliquée par l'incapacité de certaines levures à régénérer le  $\text{NAD}^+$  requis pour l'oxydation du xylitol en xylulose (Jeffries, 1981 ; Toivola *et al.*, 1984). Cependant, plusieurs espèces de levures capables de fermenter le D-xylose en éthanol sous limitation d'oxygène telles

que *S. stipitis* ont été rapportées. Ces levures sont décrites capables de fermenter le D-xylose de par la co-spécificité de leur xylose-réductase au NADPH et au NADH avec une forte affinité pour le NADH qui par opposition au NADPH permet une régénération du NAD<sup>+</sup> (Bruinenberg *et al.*, 1984 ; Bruinenberg, 1986 ; Slininger *et al.*, 2015).

Quant au L-arabinose, son catabolisme est étroitement lié à celui du D-xylose. De nombreuses études ont montré que les levures capables de fermenter le D-xylose, consommaient le L-arabinose, en différentes proportions, mais sans production d'éthanol (McMillan and Boynton, 1994 ; Dien *et al.*, 1996). En effet, la conversion du L-arabinose en xylulose se fait via l'action de 4 enzymes (la L-arabinose réductase (EC 1.1.1.21), la L-arabitol 4-déshydrogénase (EC 1.1.1.12), la L-xylulose réductase (EC 1.1.1.10) et puis la xylitol déshydrogénase) contre 2 enzymes seulement pour la conversion du D-xylose en xylulose (**Figure I.23**). Par conséquent, la formation du D-xylulose à partir du L-arabinose comparé au D-xylose nécessite un couple de NAD(P)H / NAD(P) supplémentaire. Ceci présenterait une hypothèse permettant d'expliquer la raison pour laquelle la conversion du L-arabinose en éthanol est rare, voire inexistante chez les levures fermentant le D-xylose (Magee and Kosaric, 1985 ; Witteveen *et al.*, 1989).

#### 4.5. Levures et liquides ioniques

Les LI sont considérés comme des solvants efficaces pour la solubilisation et le prétraitement de (ligno)cellulose et présentent dans une certaine mesure une compatibilité avec certaines cellulases et hémicellulases, comme discuté précédemment. De par leurs caractéristiques intéressantes, ils représentent une bonne alternative aux solvants organiques classiques, plus prometteuse d'un point de vue environnemental. Cependant, le LI résiduel qui reste piégé dans la (ligno)cellulose prétraitée exercerait un effet toxique sur les microorganismes fermentaires et le mécanisme de sa toxicité vis-à-vis des levures et des bactéries reste actuellement méconnu (Sitepu *et al.*, 2014 ; Dickinson *et al.*, 2016 ; Cao *et al.*, 2017). De nombreuses études contradictoires ont été rapportées dans la littérature attribuant l'effet délétère à l'anion constitutif du LI ou au cation ou aux deux à la fois (Ouellet *et al.*, 2011 ; Badgujar and Bhanage, 2015).

Dans ce contexte, Pernak *et al.* (2003) et Ranke *et al.* (2004) ont signalé une activité antimicrobienne des LI qui est de plus en plus importante lorsque la chaîne

alkyl du cation imidazolium est plus longue. Les auteurs ont attribué l'effet toxique observé sur de nombreux microorganismes incluant des champignons et des bactéries coques et bacilles uniquement à la longueur de la chaîne alkyl sans aucun effet de l'anion constitutif des LI.

Similairement, l'effet négligeable qu'exerce l'anion sur l'activité antimicrobienne des LI à base du cation imidazolium a été aussi mentionné par plusieurs auteurs (Lee *et al.*, 2005 ; Docherty and Kulpa, 2005 ; Teresa Garcia *et al.*, 2005). Pourtant, ce n'est pas le cas pour les LI à base du cation phosphonium où la structure du cation et le type de l'anion ont tous les deux un effet sur l'activité biologique (Cieniecka-Rosłonkiewicz *et al.*, 2005).

Ganske and Bornscheuer (2006) ont observé un effet prépondérant de l'anion constitutif du LI constitué d'un cation imidazolium sur la levure *Pichia pastoris*. En effet, *P. pastoris* tolère le 1-butyl-3-méthyl imidazolium hexafluorophosphate, [Bmim][PF<sub>6</sub>] jusqu'à une concentration de 10% (v/v) sans que sa croissance soit affectée. Par contre, le 1-butyl-3-méthyl imidazolium tétrafluoroborate, [BMIM][BF<sub>4</sub>] avait un effet délétère sur *P. pastoris* même à une concentration de 1% (v/v).

Les travaux de Mehmood *et al.* (2015) ont montré que l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] affectent, voire inhibent, la croissance de la levure *S. cerevisiae* pour une concentration  $\geq 1\%$  d'[Emim][OAc] ou  $\geq 2\%$  d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Par ailleurs, la levure *K. marxianus* s'est montrée plus tolérante que *S. cerevisiae* vis-à-vis de ces deux LI : 2% d'[Emim][OAc] et 6% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Mehmood *et al.*, 2018). Cet effet toxique de l'[Emim][OAc] a aussi été décrit sur *S. cerevisiae* par Sitepu *et al.* (2014) et sur la levure *Geotrichum fermentans* par Liu *et al.* (2016a). L'effet néfaste des LI sur les cellules microbiennes pourrait être expliqué par l'interaction de ce dernier avec les polysaccharides de la paroi cellulaire des levures. Similairement à l'effet du LI qui désorganise la structure tridimensionnelle de la BLC formée principalement de polysaccharides, il est suggéré que les LI déstructurent de la même façon la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* (Mehmood *et al.*, 2015). En outre, il a été démontré que les LI induisent un shift du métabolisme respiratoire vers le métabolisme fermentaire chez *S. cerevisiae* et *K. marxianus*, ce qui suggère que les LI affectent la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018). En revanche, cette transition métabolique induite par des concentrations déterminées

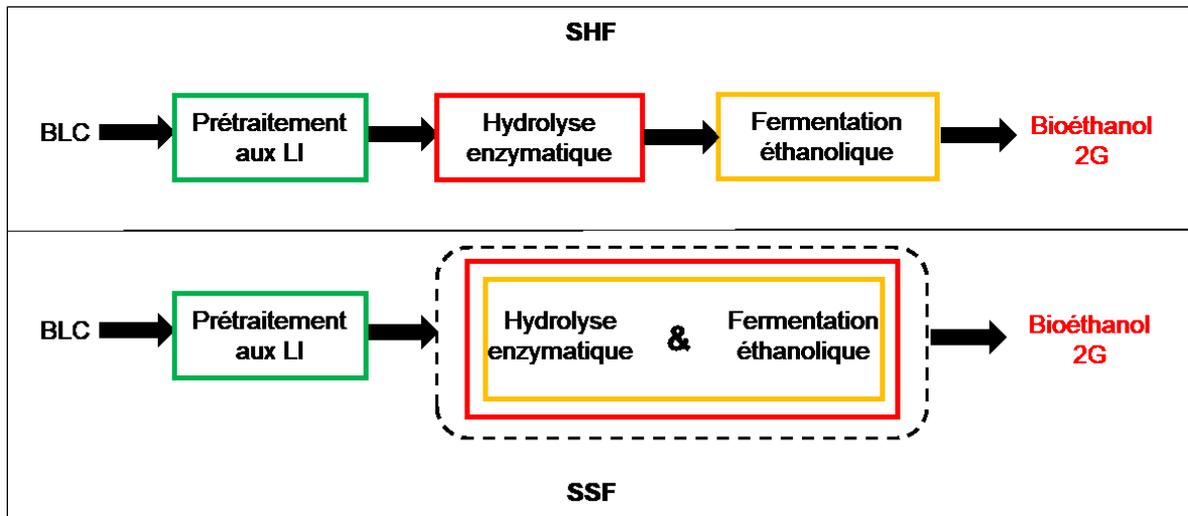
de LI favorise la production de l'éthanol par les deux levures *S. cerevisiae* et *K. marxianus* malgré que la croissance est inhibée (1% (v/v) d'[Emim][OAc] ou 4% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]), ce qui est avantageux pour la production de bioéthanol 2G (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018). De même, la bactérie *Lactobacillus kefir* montrait une meilleure productivité d'acide lactique en présence de 20% (v/v) d'[Emim][PF<sub>6</sub>] (Pfruender *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'[Emim][OAc] ainsi que l'[Emim][Cl] et l'[Bmim][Cl] sembleraient altérer principalement la fonction mitochondriale de la levure *S. cerevisiae* en induisant une hyperpolarisation de la membrane de la mitochondrie (Dickinson *et al.*, 2016). Il est supposé que l'altération du potentiel membranaire de la mitochondrie induit la production des dérivés réactifs de l'oxygène et par suite l'apoptose (Pereira *et al.*, 2008). D'autres aspects de toxicité pourraient être observés en inhibant la consommation des sucres et les activités des enzymes telles que l'enzyme malique et l'ATP citrate lyase (Liu *et al.*, 2016a).

L'effet du LI, ne peut pas être généralisé, il est donc dépendant de la nature du LI, des ions qui le constituent, de sa concentration, mais aussi du type de microorganisme testé.

#### **4.6. Stratégies d'hydrolyse enzymatique et de fermentation**

Différents procédés d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique existent qui consistent principalement, comme montré dans la **Figure I.24**, à séparer l'hydrolyse enzymatique de la fermentation éthanolique selon un procédé séquentiel, Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) ou de les combiner selon un procédé simultané, Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF).



**Figure I.24.** Représentation schématique des procédés d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF : procédé séquentiel et SSF : procédé simultané

#### 4.6.1. SHF : Separate Hydrolysis and Fermentation

Dans ce procédé séquentiel, la BLC prétraitée est hydrolysée en sucres fermentescibles qui, ensuite sont fermentés en éthanol. L'avantage majeur est qu'il est possible de réaliser l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides et la fermentation éthanolique chacune dans les conditions optimales. En effet, la température optimale des cellulases est généralement comprise entre 40 et 50° C, selon l'origine des enzymes (Söderström *et al.*, 2003 ; Wingren *et al.*, 2003) alors que la température optimale pour les microorganismes produisant l'éthanol est entre 30 et 35°C (Sun and Cheng, 2002).

Le principal inconvénient de la SHF est l'inhibition de l'activité des cellulases par les sucres libérés, principalement le cellobiose et le glucose. Ainsi pour une concentration en cellobiose de 6 g/L, l'activité des cellulases est réduite de 60%. D'autre part, le glucose est un inhibiteur fort de la  $\beta$ -glucosidase dont l'activité diminue de 75% pour une concentration de glucose de 3 g/L (Philippidis and Smith, 1995).

#### 4.6.2. SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation

L'une des méthodes les plus prometteuses pour la production d'éthanol à partir de la BLC est la combinaison de l'hydrolyse enzymatique de la BLC prétraitée et la fermentation éthanolique en une seule étape désignée par le terme de SSF. Durant ce procédé, le glucose libéré par les cellulases est immédiatement consommé par les levures présentes dans le milieu de culture. Cela est déjà un avantage important de la

SSF comparée à la SHF, étant donné que l'effet inhibiteur qu'exercent à la fois le cellobiose et le glucose sur les cellulases est minimisé en gardant une concentration faible de ces 2 sucres dans le milieu. La SSF génère des rendements rapportés en éthanol plus élevés que la SHF et exige des quantités plus faibles d'enzymes (Sun and Cheng, 2002 ; Karimi *et al.*, 2006). Le risque de contamination dans le procédé de SSF est plus faible que dans la SHF, cela revient au fait que la présence d'éthanol dans le milieu réduit la possibilité de contamination et aussi parce que la SSF s'effectue en moins d'étapes que la SHF.

Une stratégie importante durant la SSF est d'avoir les conditions expérimentales correctes pour la saccharification et la fermentation, particulièrement avec le respect du pH et la température. Plusieurs microorganismes thermotolérants tels que la levure *K. marxianus* sont proposés en SSF dans le but d'augmenter la température et la rendre plus proche de la température optimale de l'hydrolyse enzymatique. L'inhibition des cellulases par l'éthanol produit peut-être aussi un problème dans la SSF. Wu and Lee (1997) ont signalé que l'activité des enzymes peut être réduite de 9%, 36% et 64% pour des concentrations en éthanol de 9, 35 et 60 g/L, respectivement à 38°C.

#### 4.6.3. SScoF ou SSCF : Saccharification et Co-Fermentation Simultanées

Conformément au concept de bioraffinerie visant à valoriser la plante dans son intégralité, une autre technique a été décrite permettant de convertir non seulement la fraction cellulosique mais aussi la partie hémicellulosique en bioéthanol 2G. La SSCF est ainsi considérée comme un processus prometteur consistant en une hydrolyse enzymatique simultanée de la cellulose et de l'hémicellulose, respectivement, par les cellulases et les hémicellulases, notamment les xylanases, couplée à une co-fermentation simultanée des hexoses et des pentoses. Cette co-fermentation implique l'utilisation de deux espèces de micro-organismes en co-culture, l'un fermentant les hexoses tels que *S. cerevisiae* ou *Z. mobilis* et l'autre fermentant les pentoses tels que *S. stipitis* ou *S. shehatae* (Koppram *et al.*, 2013 ; Yasuda *et al.*, 2014).

Dans notre étude, les deux procédés SHF et SSF seront étudiés sur les polymères modèles (cellulose et xylane) ainsi que sur les substrats lignocellulosiques (saule blanc et son de blé désamidonné).

# Chapitre II :

## *Matériels et Méthodes*

## 1. Matériels

### 1.1. Substrats (ligno)cellulosiques

Deux types de cellulose modèle extraite du coton avec un degré de pureté élevée et provenant de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) ont été sélectionnés dans cette étude : la cellulose moyennes fibres et la cellulose longues fibres, se caractérisant par une taille de fibres allant de 50 à 350  $\mu\text{m}$  et de 125 à 400  $\mu\text{m}$ , respectivement (Örmeci and Vesilind, 2000 ; Husson *et al.*, 2011).

Le xylane modèle est le xylane de hêtre, présentant une taille de particules inférieure à 850  $\mu\text{m}$ , extrait du bois de hêtre par un traitement alcalin et acquis auprès d'Apollo Scientific.

La lignine modèle utilisée dans cette étude est la lignine Kraft, extraite du bois des résineux par traitement alcalin selon le procédé Kraft et provenant de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Les échantillons du son de blé désamidonné, DWB (Destarched Wheat Bran), fourni gracieusement par la société Chamtor (Pomacle-Bazancourt, France) dans le cadre du projet interreg IV, ValBran pour la valorisation du son de blé ([www.valbran.eu/fr](http://www.valbran.eu/fr)).

Les résidus du saule blanc (*Salix alba*) ont été collectés après élagage sur le site de l'UFR des Sciences de l'Université de Picardie Jules Vernes, Amiens, France.

Afin d'assurer une homogénéité des substrats lignocellulosiques et une solubilisation efficace dans les liquides ioniques, le son de blé désamidonné et le saule blanc ont été lyophilisés et broyés à l'aide d'un broyeur vibrant à billes (RETSCH MM400) pendant 2 minutes à 30 Hz. Après broyage, les substrats sont retrouvés sous forme de poudre fine.

Les différents types de substrats (modèles et lignocellulosiques) utilisés dans cette étude ainsi que leur origine et leurs tailles de particules sont regroupés dans le **Tableau II.1.**

Tableau II.1. Substrats utilisés dans cette étude

Substrat	Origine	Taille de particules ( $\mu\text{m}$ )	Fournisseur
Cellulose longues fibres	Coton	125 – 400 <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne)
Cellulose moyennes fibres	Coton	50 – 350 <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne)
Xylane	Feuillus	< 850 <sup>b</sup>	Apollo Scientific (Stockport, Royaume Uni)
Lignine	Résineux	ND <sup>c</sup>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne)
Son de blé désamidonné	Céréales	ND <sup>c</sup>	UMR 614 FARE INRA – URCA (Reims, France)
Saule Blanc	Feuillus	ND <sup>c</sup>	Site de l'UFR des Sciences, UPJV (Amiens, France)

a : déterminée d'après Örmeci and Vesilind (2000)

b : donnée du fournisseur (Apollo Scientific)

c : ND : non déterminé

## 1.2. Liquides ioniques

Deux liquides ioniques (LI) hydrophiles dérivés du cation imidazolium ont été sélectionnés pour le prétraitement des substrats (ligno)cellulosiques et ont été acquis auprès de Solvionic SA (Verniolle, France) avec un degré de pureté > 98% : le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate ([Emim][OAc]) et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate ([Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]) (Figure II.1).

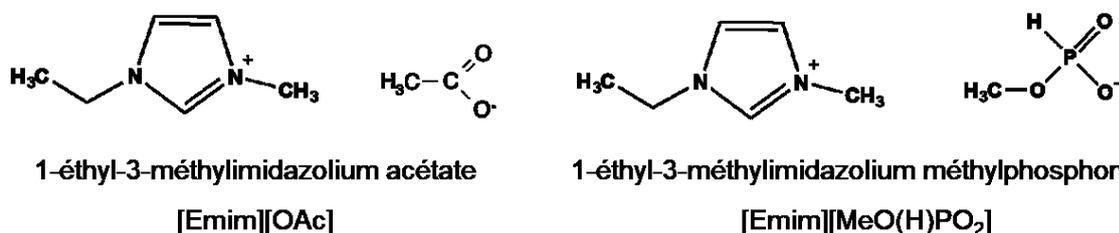


Figure II.1. Représentation de la structure chimique des LI hydrophiles utilisés dans cette étude

### 1.3. Enzymes

Toutes les enzymes utilisées dans cette étude proviennent de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Il s'agit :

- Des cellulases de *Trichoderma reesei* (EC 3.2.1.4) présentant une activité spécifique de 8 U/mg (une unité libérant 1,0  $\mu$ mole de glucose à partir de cellulose par heure à pH 5 et à 37°C),

- Des endoxylanases de *Trichoderma longibrachiatum* (EC 3.2.1.8) possédant une activité spécifique de 7,7 U/mg (une unité libérant 1,0  $\mu$ mole de xylose à partir de xylane par minute à pH 4,5 et à 30°C).

### 1.4. Levures et milieux de culture

Quatre espèces de levures ont été sélectionnées dans cette étude, à savoir *Saccharomyces cerevisiae* YSC2 Type II de chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne), *Kluyveromyces marxianus* UMIP 2234.94 fournie par le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, *Scheffersomyces shehatae* CLIB 1339 et *Scheffersomyces stipitis* CLIB 187.

Les produits utilisés pour la préparation de milieux de culture des levures ainsi que leur provenance sont listés dans le **Tableau II.2**.

**Tableau II.2.** Produits utilisés pour la réalisation de milieux de culture des levures

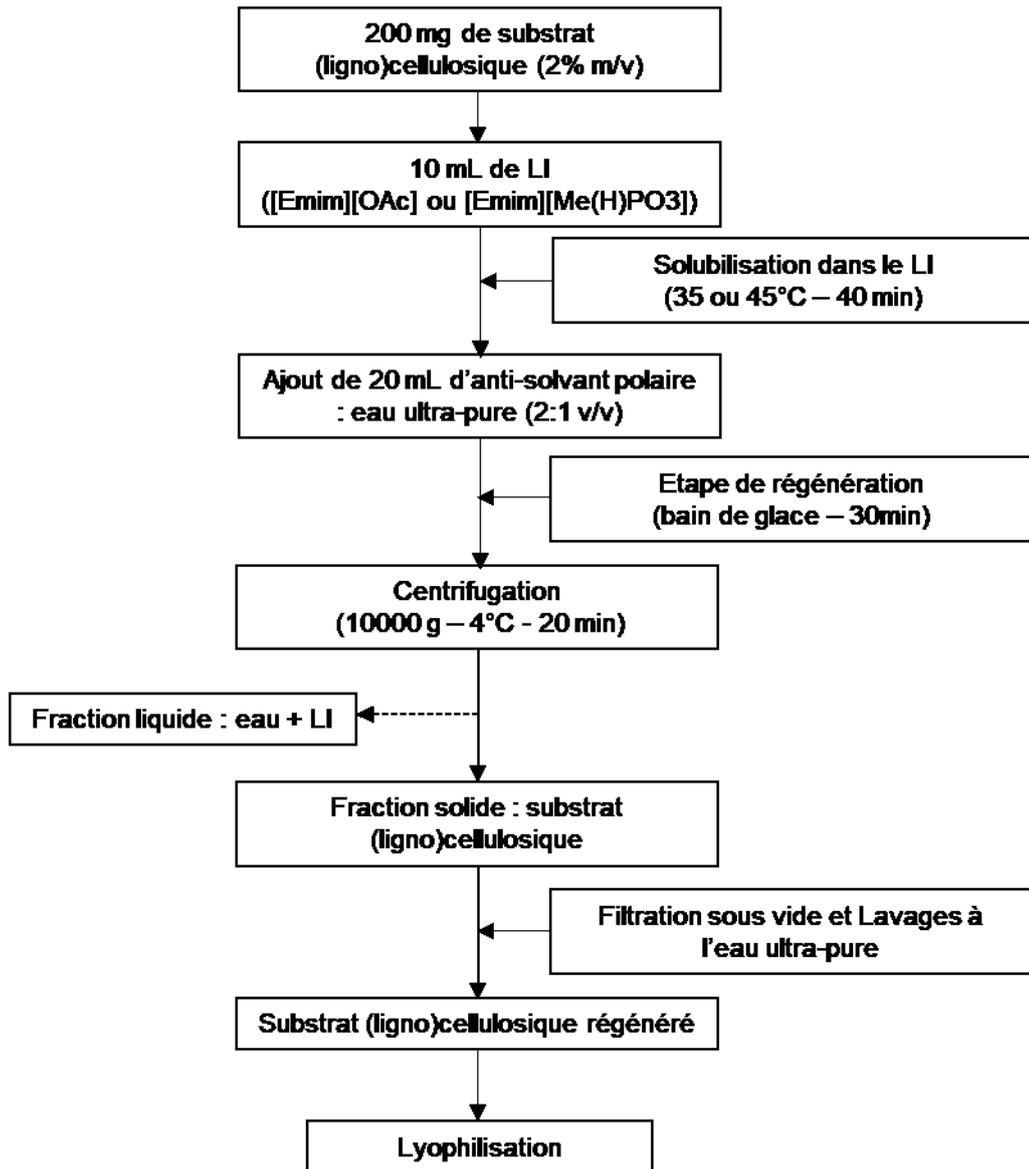
Produit	Fournisseur
Peptone	Merck (Darmstadt, Allemagne)
Extrait de Malt	Merck (Darmstadt, Allemagne)
Extrait de levure	Merck (Darmstadt, Allemagne)
Sucre : glucose, galactose, mannose, xylose, xylitol, arabinose et cellobiose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne)
Agar	Fisher scientifique (Loughborough, UK)

## 2. Prétraitement par liquide ionique

Deux cent milligrammes de substrat (ligno)cellulosique lyophilisé : la cellulose longues fibres, les échantillons de sciures de chêne ou d'épicéa sont incubés dans 10 mL de LI pur ([Emim][OAc] ou [Emim][Me(H)PO<sub>3</sub>]) (2% masse substrat/volume du LI) sous agitation vigoureuse dans un bain-marie thermostaté à 45°C pendant 40 minutes. Dans d'autres conditions expérimentales, pour les échantillons de cellulose moyennes fibres et ceux de son de blé ainsi que du saule blanc, la température d'incubation est baissée à 35°C (afin de diminuer la demande énergétique du procédé de prétraitement et pour être plus proche de la température optimale de fermentation éthanolique dans l'optique de combiner le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique), les autres paramètres restent inchangés : LI ([Emim][OAc] ou [Emim][Me(H)PO<sub>3</sub>]), charge substrat/LI (2% m/v) et durée d'incubation (40 min).

Après ce temps d'incubation, une étape de régénération (précipitation de la cellulose par ajout d'un solvant polaire) est réalisée par l'ajout de 20 mL d'eau ultra-pure (résistivité égale à 18,3 MΩ cm, Barnsted Easy Pure RF), considérée comme anti-solvant (2 :1 v/v eau/LI), aux suspensions (substrat (ligno)cellulosique + LI) mises ensuite sous agitation dans un bain de glace pendant 30 minutes dans l'ordre d'augmenter la polarité du milieu (Husson *et al.*, 2011). La suspension est ensuite centrifugée (10000 g, 20 min, 4°C, rotor Allegra 64R Beckman Coulter F0850) permettant de séparer la fraction solide (substrat prétraité) de la fraction liquide (LI et eau). La fraction solide riche en cellulose, quant à elle, est filtrée sous vide sur un filtre de porosité 0,45 µm, puis lavée abondamment à l'eau ultra-pure et lyophilisée.

La **Figure II.2** récapitule les différentes étapes du procédé de prétraitement par les LI utilisé pour la réalisation des travaux.



**Figure II.2.** Représentation schématique globale du prétraitement des substrats (ligno)cellulosiques par les LI réalisé dans cette étude

### 3. Hydrolyse enzymatique

#### 3.1. Cellulose modèle moyennes fibres

Les échantillons cellulosiques lyophilisés non traités ou prétraités aux LI (2% m/v) sont transvasés dans des fioles d'erlenmeyer de 100 mL et incubés dans du tampon acétate (50 mM, pH 4,8) sous agitation (150 rpm) pendant 30 min à 30°C. Après ce temps d'hydratation, l'hydrolyse est ensuite initiée par l'ajout dans le milieu réactionnel ( $V_T = 20$  mL) de 2 mL d'une préparation de cellulases de *Trichoderma reesei* à 10 g/L (préparée en ajoutant 150 mg d'enzymes dans 15 mL du tampon acétate (50 mM, pH

4,8)). L'hydrolyse enzymatique est réalisée à 30°C pendant 80 h sous une agitation de 150 rpm. Les concentrations en cellulose longues fibres et en enzymes sont de 2% (m/v) et de 1 g/L, respectivement.

Dans certaines conditions expérimentales, du xylane modèle (50 µg) et/ou de la lignine Kraft (100 µg) sont ajoutés au milieu réactionnel afin d'étudier l'effet de ces deux substrats sur l'activité des cellulases.

### **3.2. Xylane modèle**

Les échantillons de xylane de hêtre possédant un degré de polymérisation (80 – 200) largement inférieur à celui de la cellulose (167 – 1616) (Ibrahim *et al.*, 2010) et une structure plus amorphe n'ont pas été prétraités aux LI. L'hydrolyse enzymatique du xylane est réalisée par les xylanases de *Trichoderma longibrachiatum* en tampon acétate (50 mM, pH 4,8) à 30°C pendant 80 h sous une agitation de 150 rpm. En introduisant 2 mL d'une préparation de xylanases à 30 g/L dans le milieu réactionnel ( $V_T = 20$  mL), les concentrations en xylane et en enzymes sont de 2% (m/v) et de 3 g/L, respectivement. Dans certaines conditions expérimentales, la concentration finale en xylanases est de 1 ou 5 g/L, les autres conditions expérimentales restant invariables (température : 30°C, agitation : 150 rpm, charge en substrat : 2% m/v et  $V_T$  du milieu réactionnel = 20 mL). Dans d'autres conditions expérimentales, de la cellulose modèle moyennes fibres non traitée ou prétraitée (200 µg) et/ou de la lignine Kraft (100µg) sont introduites dans le milieu réactionnel dans le but de tester l'effet de ces deux composants sur l'hydrolyse du xylane par les xylanases à 30°C.

### **3.3. Cellulose & xylane**

L'hydrolyse enzymatique simultanée des échantillons de cellulose moyennes fibres lyophilisés non traités ou prétraités (400 µg) et des échantillons du xylane (400 µg) est réalisée par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* en tampon acétate (50 mM, pH 4,8) sous 150 rpm d'agitation pendant 80 h à 30°C. Dans le milieu réactionnel dont le  $V_T = 20$  mL sont introduits 2 mL d'une solution de cellulases préparée dans du tampon acétate à 10 g/L ainsi que 2 mL d'une solution de xylanases préparée dans du tampon acétate à 30 g/L. Les concentrations en cellulases et en xylanases sont donc de 1 et 3 g/L, respectivement. Ainsi, les charges enzymes : substrat ; cellulases : cellulose et xylanases : xylane sont identiques aux

conditions précédentes. Pourtant, la concentration en substrat, étant de 4% (m/v) : (2% (m/v) cellulose & 2%(m/v) xylane), n'est plus identique aux conditions précédentes (2% m/v).

### **3.4. Substrats lignocellulosiques : saule blanc et son de blé désamidonné**

Les échantillons du saule blanc ou du son de blé désamidonné lyophilisés non traités ou prétraités (2% m/v) sont ajoutés au tampon acétate (50 mM, pH 4,8) dans des fioles d'erlenmeyer de 50 mL pendant 30 min à 30°C. L'hydrolyse est ensuite initiée par ajout de 1 mL d'une préparation de cellulases de *T. reesei* (10 g/L) et 1 mL de xylanases de *T. longibrachiatum* (30 g/L) dans le milieu réactionnel ( $V_T = 10$  mL). Les concentrations en substrat, en cellulases et en xylanases sont de 2% (m/v), 1 et 3 g/L, respectivement. L'hydrolyse enzymatique des échantillons du saule blanc et du son de blé et catalysée à la fois par les cellulases et les xylanases est réalisée à 30°C pendant 80 h sous une agitation de 150 rpm.

Un suivi cinétique permettant de déterminer l'avancement de la réaction a été réalisé. Pour ce faire, des prélèvements du milieu réactionnel à différents temps sont effectués et la réaction enzymatique est arrêtée en incubant les échantillons prélevés pendant 20 min à 90°C pour désactiver les enzymes. Avant d'être analysés par chromatographie liquide haute performance (ThermoFisher HPLC-RI Ultimate 3000 Basic), les échantillons ont été dilués dans de l'eau ultra-pure puis filtrés (0,2  $\mu$ m). Chaque cinétique d'hydrolyse enzymatique est répétée deux fois.

## **4. Fermentation éthanolique**

### **4.1. Monosaccharides ou cellobiose**

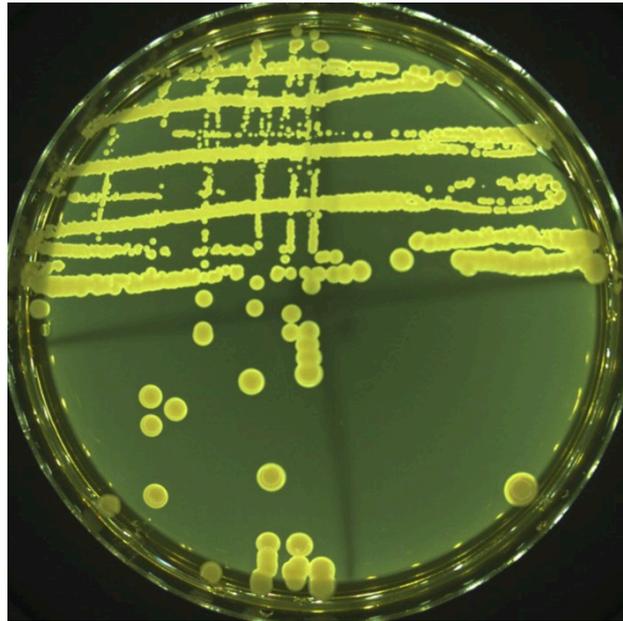
Les cultures de chacune des 4 espèces de levures sélectionnées sont réalisées en milieu Yeast-Malt (YM) : extrait de levure 3 g/L, peptone 3 g/L, extrait de malt 3 g/L, pH 4,8, additionné de monosaccharides constitutifs de la biomasse lignocellulosique comme source de carbone à 20 g/L : soit un hexose (D-glucose, D-galactose ou D-mannose), soit un pentose (D-xylose, D-arabinose, L-arabinose ou xylitol) stérilisé par autoclave pendant 20 min à 121°C. Le xylitol, un pentitol produit lors du catabolisme du xylose a été également testé. De plus, des cultures de levures ont été effectuées en milieu YM ajouté d'un disaccharide de glucose, le cellobiose à 20 g/L. Dans d'autres

conditions expérimentales, des cultures de levures ont été menées en milieu YM complété d'un mélange de sucres, soit d'hexoses (glucose, galactose et mannose à 7 g/L chacun), soit un mélange de glucose et de xylose (à 10 g/L chacun) ou bien un mélange de xylose et de xylitol (à 10 g/L chacun). Il est à noter que des cultures des 4 espèces de levures en milieu YM seul sans ajout de sucre ont été également réalisées. Par ailleurs, dans certaines conditions expérimentales, des faibles concentrations (0 à 4% v/v) en LI : l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ont été ajoutées au milieu de culture YM glucose, afin d'évaluer l'effet de faibles concentrations en LI sur les levures.

Les cultures sont réalisées dans des fioles d'erenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu YM sucre, soit à bouchons en coton cardé pour les conditions aérobies, soit à bouchons étanches pour celles anaérobies. Les conditions de culture étaient 30°C pour *S. cerevisiae*, *S. shehatae* et *S. stipitis* et 35°C pour *K. marxianus*, sous une agitation de 150 rpm. Les colonies de levures sont conservées à 4°C, sur boîtes de milieu Yeast-Malt glucose gélosé préparé en solidifiant le milieu YM glucose liquide par l'ajout de 20 g/L d'agar et stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 121°C.

Pour chaque expérience, une colonie de levure est utilisée pour inoculer une préculture de 20 mL de milieu YM glucose ou YM sucre. Après 16 h d'incubation (en phase exponentielle), un millilitre de préculture est utilisé pour inoculer les cultures.

Des prélèvements du milieu réactionnel sont effectués à différents temps afin de déterminer l'avancement de la réaction. La croissance de levures a été régulièrement suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) et les concentrations de sucres et d'éthanol ont été déterminées par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) sur un équipement ThermoFisher Ultimate 3000 Basic. Chaque condition de culture a été répétée 2 fois. En fin de chaque culture réalisée dans cette étude, la pureté des cultures est vérifiée en réalisant des isolements sur boîtes de milieu YM glucose gélosé puis les incubant à 30°C pendant au moins 48 h. Ci-dessous est montrée une photo d'un isolement de culture de la levure *Scheffersomyces shehatae* sur milieu YM glucose, prise à l'aide de l'appareil de compteurs automatiques de colonies : Scan 300, muni du logiciel Scan version 8 (**Figure II.3**).



**Figure II.3.** Photo d'une culture de *S. shehatae* sur milieu YM glucose gélifié, montrant la pureté de la culture

## 4.2. Substrats modèles et lignocellulosiques

### 4.2.1. Cellulose moyennes fibres

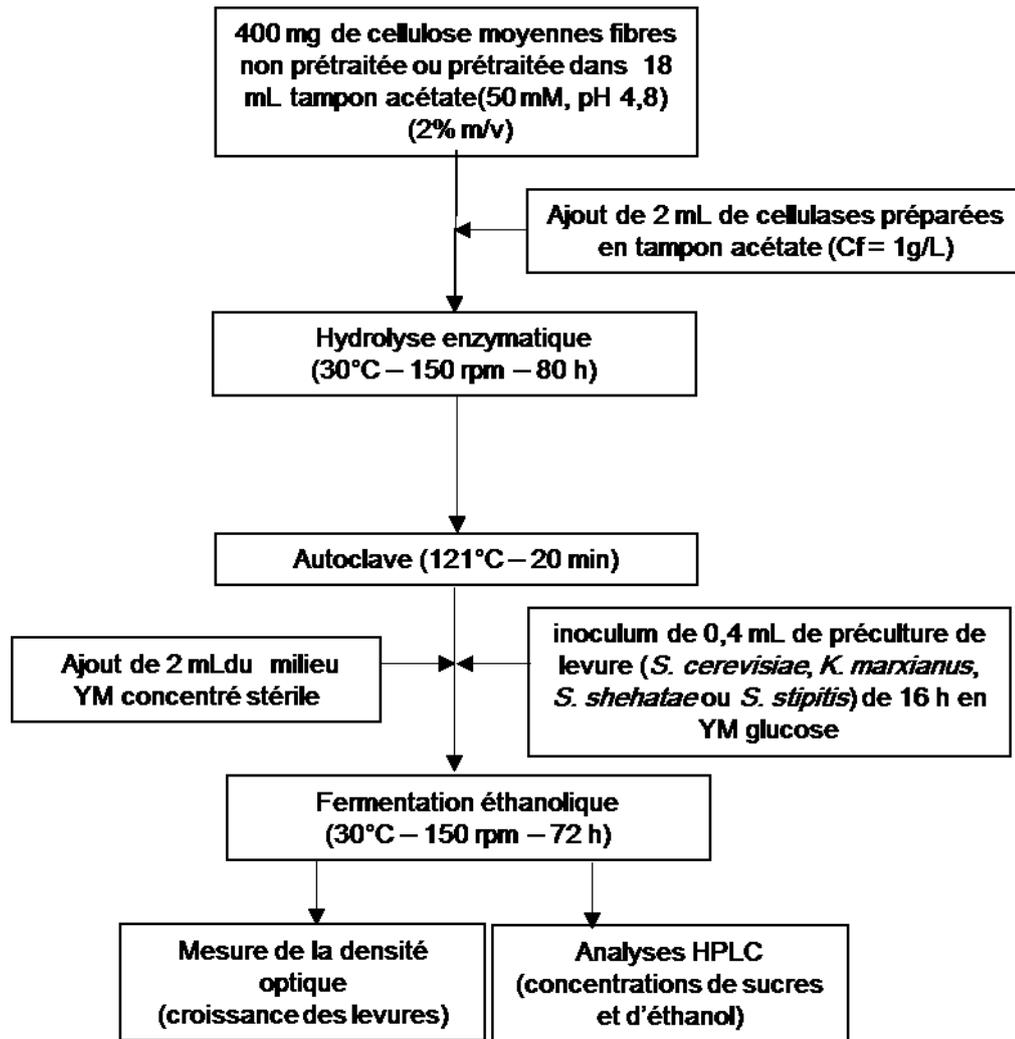
Pour la conversion de la cellulose modèle moyenne fibre, du xylane modèle, des résidus de saule blanc et des échantillons de son de blé désamidonné en bioéthanol, deux options sont testées, soit en séparant l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique selon un procédé séquentiel désigné par SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation), soit en les combinant selon un procédé simultané, SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Pour l'étape de fermentation des hydrolysats enzymatiques de la cellulose moyennes fibres, les quatre espèces de levures : *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* et *S. stipitis* sont testées.

#### 4.2.1.1. Procédé séquentiel, SHF

Durant le procédé séquentiel, SHF, de la cellulose moyennes fibres, l'hydrolyse enzymatique des échantillons de cellulose lyophilisés non traités ou prétraités à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] est réalisée en tampon acétate (50 mM, pH 4,8) par les cellulases de *T. reesei* à 30°C sous une agitation de 150 rpm pendant 80 h, comme décrit précédemment. Chaque condition a été répétée deux fois.

La cellulose moyennes fibres non prétraitée ou prétraitée aux LI (400 mg) est transvasée dans des fioles d'erlenmeyer de 100 mL contenant du tampon acétate (18

mL). Le volume total ( $V_T$ ) du milieu réactionnel est complété à 20 mL en ajoutant 2 mL de la solution de cellulases préparée en tampon acétate à 10 g/L. Les concentrations en cellulose et en cellulases sont de 2% m/v et 1 g/L, respectivement. Après 80 h d'hydrolyse enzymatique, les milieux réactionnels sont stérilisés à l'autoclave (20 min - 121°C). Afin d'aboutir aux concentrations adéquates en milieu YM (soit 3 g/L de peptone, 3 g/L d'extrait de malt et 3 g/L d'extrait de levure) 2 mL du milieu YM concentré sont introduits dans le milieu réactionnel. Pour initier les cultures de levures, 0,4 mL de préculture de 16 h (en phase exponentielle) réalisée en milieu YM glucose sont ajoutés aux milieux de culture. Quelle que soit l'espèce de levure utilisée (*S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* ou *S. stipitis*), les cultures de levures sont réalisées à 30°C sous une agitation de 150 rpm. Des prélèvements au cours du temps sont réalisés afin de suivre la croissance des levures (mesure de  $DO_{600nm}$ ) et les concentrations des sucres et d'éthanol (HPLC). Chaque condition de culture a été répétée deux fois. Les différentes étapes pour la réalisation du procédé séquentiel SHF d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique de la cellulose moyennes fibres sont récapitulées dans la **Figure II.4**.

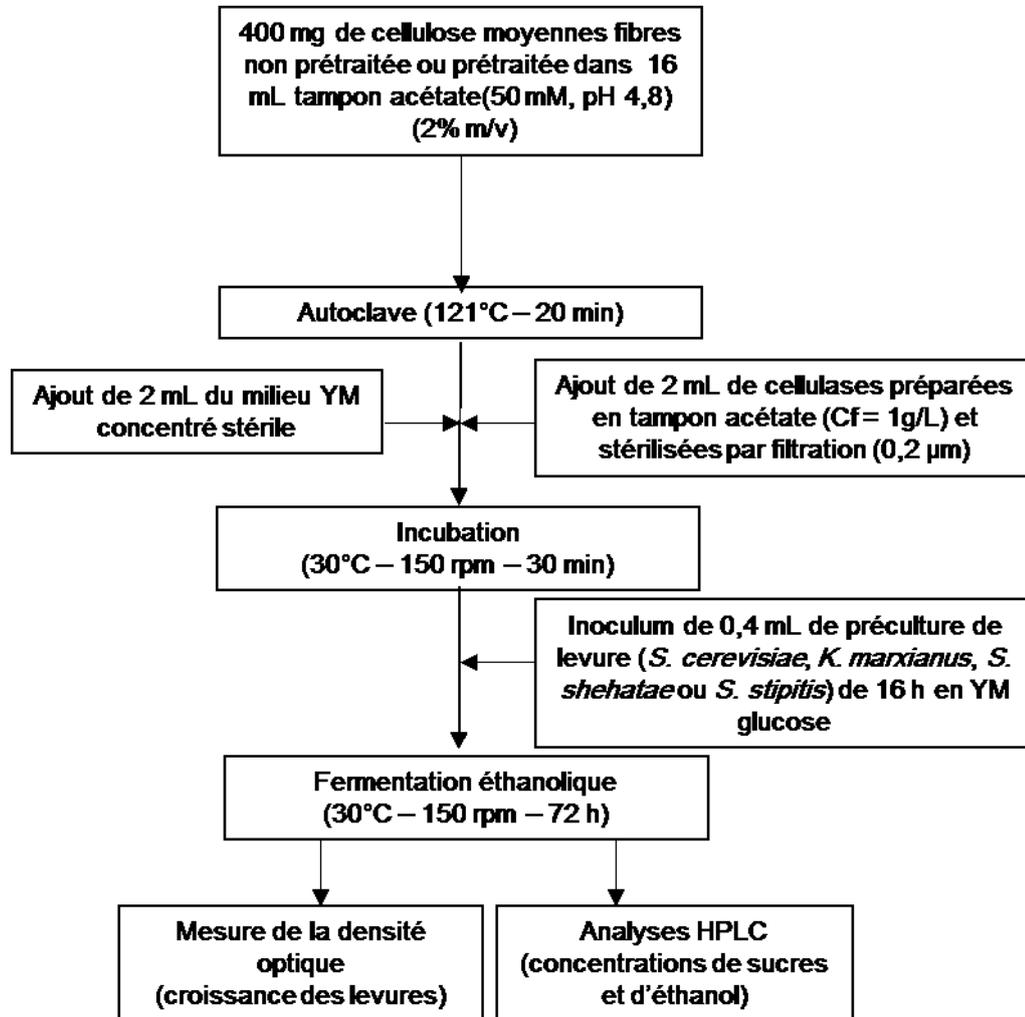


**Figure II.4.** Représentation schématique globale du procédé séquentiel SHF réalisé dans cette étude

#### 4.2.1.2. Procédé simultané, SSF

Durant le procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose moyennes fibres par les cellulases de *T. reesei* est réalisée simultanément à la fermentation éthanolique par les levures. Comme pour la SHF, la SSF est réalisée dans des fioles d'erlenmeyer de 100 mL avec des bouchons en coton cardé pour un volume réactionnel ( $V_T = 20$  mL). Les échantillons de cellulose moyennes fibres non prétraités ou prétraités aux LI (400 mg) sont ajoutés à 16 mL de tampon acétate puis stérilisés en autoclave (121°C, 20 min). Après ajout de 2 mL du milieu YM concentré, l'hydrolyse enzymatique est initiée en introduisant 2 mL de la solution de cellulases en tampon acétate (10 g/L) stérilisée par filtration (0,2  $\mu$ m). Les concentrations finales en cellulose et en cellulases sont respectivement de 2% m/v et 1 g/L. Après 30 min d'incubation à 30°C sous agitation (150 rpm), les milieux

sont inoculés par 0,4 mL de préculture de levure de 16 h en YM glucose. La SSF est réalisée à 30°C sous une agitation de 150 rpm pour toutes les espèces de levures testées : *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* ou *S. stipitis*. Chaque culture est réalisée en deux répétitions. La **Figure II.5** illustre les étapes globales du procédé simultané SSF de la cellulose moyennes fibres.



**Figure II.5.** Représentation schématique globale du procédé simultané SSF de la cellulose réalisé dans cette étude

#### 4.2.2. Xylane

Comme pour la cellulose modèle moyennes fibres, la fermentation éthanolique des hydrolysats enzymatiques du xylane est réalisée soit séquentiellement à l'étape d'hydrolyse enzymatique selon le procédé SHF soit simultanément selon le procédé SSF. Les deux espèces de levures *S. shehatae* et *S. stipitis* sont testées pour l'étape de fermentation des hydrolysats enzymatiques du xylane.

#### 4.2.2.1. Procédé séquentiel, SHF

Durant ce procédé, l'hydrolyse enzymatique du xylane modèle non prétraité (400 mg) catalysée par les xylanases de *T. longibrachiatum* est réalisée en tampon acétate (18 mL) dans des erlens de 100 mL à 30°C pendant 80 h sous 150 rpm d'agitation. Pour un volume réactionnel total  $V_T = 20$  mL, 2 mL d'une solution de xylanases en tampon acétate à 30 g/L sont ajoutés et les concentrations en xylane et en xylanases sont 2% m/v et 3 g/L, respectivement. Après autoclave (20 min – 121°C), 2 mL du milieu YM concentré sont ajoutés avant d'inoculer les cultures de levures par 0,4 mL de préculture de 16 h en YM glucose soit de *S. shehatae* ou de *S. stipitis*. Les cultures de *S. shehatae* ou *S. stipitis* sur les hydrolysats enzymatiques du xylane sont réalisées à 30°C sous une agitation de 150 rpm. Les cultures de chaque levure sont réalisées en duplicat. La croissance des levures (mesure de  $DO_{600nm}$ ) ainsi que les concentrations du xylose et d'éthanol (HPLC) sont déterminées régulièrement en effectuant un suivi cinétique.

#### 4.2.2.2. Procédé simultané, SSF

Durant la SSF du xylane modèle, l'étape d'hydrolyse enzymatique par les xylanases et celle de fermentation éthanolique par *S. shehatae* ou *S. stipitis* sont réalisées simultanément à 30°C sous agitation (150 rpm). Pour ce faire, 400 mg du xylane (2% m/v) sont transvasés dans des fioles d'erlenmeyer de 100 mL contenant 16 mL du tampon acétate avec 2 mL du milieu YM concentré. L'hydrolyse enzymatique est initiée en ajoutant dans le milieu réactionnel ( $V_T = 20$  mL) 2 mL de xylanases préparées en tampon acétate (30 g/L) et la concentration en enzymes dans le milieu est donc 3 g/L. Les enzymes sont stérilisées par filtration sur filtres de porosité de 0,2  $\mu$ m. Après 30 min d'incubation des milieux à 30°C sous agitation, les cultures de levures sont inoculées en ajoutant 0,4 mL de préculture de 16 h en YM glucose de *S. shehatae* ou *S. stipitis*. La SSF du xylane est réalisée à 30°C sous 150 rpm d'agitation, avec deux répétitions pour chaque condition.

#### 4.2.3. Cellulose moyennes fibres & Xylane

Pour la production de bioéthanol à partir d'un mélange de substrats modèles : cellulose moyennes fibres et xylane, deux options sont testées : le procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF et le procédé simultané, SSF.

##### 4.2.3.1. Procédé séquentiel, SHF

L'hydrolyse enzymatique simultanée des échantillons de cellulose moyennes fibres non prétraités ou prétraités (400 mg) et ceux de xylane (400 mg) est réalisée à 30°C par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum*, respectivement, dans des erlens de 100 mL avec 16 mL de tampon acétate sous agitation. En ajoutant 2 mL d'une solution de cellulases (10 g/L) et 2 mL d'une solution de xylanases (30 g/L) dans le milieu réactionnel (VT = 20 mL), les concentrations en cellulases, xylanases et en substrat sont respectivement, 1 g/L, 3 g/L et 4% m/v. Après 80 h d'hydrolyse enzymatique les milieux réactionnels sont passés en autoclave (121°C, 20 min). L'étape de fermentation éthanolique par *S. shehatae* est conduite à 30°C sous une agitation de 150 rpm après ajout de 2 mL de milieu YM concentré en inoculant 0,4 mL de préculture de *S. shehatae* de 16 h en YM glucose. Les cultures de *S. shehatae* sur les hydrolysats enzymatiques de cellulose moyennes fibres et du xylane sont répétées deux fois.

##### 4.2.3.2. Procédé simultané, SSF

Durant le procédé SSF, les échantillons de cellulose moyennes fibres non prétraités ou prétraités et ceux du xylane sont ajoutés à 14 mL de tampon acétate et 2 mL de milieu YM concentré dans des erlens de 100 mL. La concentration en substrat (cellulose & xylane) est de 4% m/v. Après l'ajout des enzymes, stérilisées par filtration (filtre de 0,2 µm) : 2 mL de cellulases (10 g/L) et 2 mL de xylanases (30 mL), les milieux sont incubés à 30°C pendant 30 min sous agitation. Les concentrations en cellulases et en xylanases sont 1 et 3 g/L, respectivement. Ensuite, les milieux sont inoculés avec 0,4 mL de préculture de *S. shehatae* de 16 h en YM glucose pour l'étape de fermentation éthanolique. La SSF du mélange de cellulose et du xylane est réalisée à 30°C en deux répétitions.

#### 4.2.4. Echantillons de saule blanc et de son de blé désamidonné

Pour les échantillons du son de blé désamidonné et ceux du saule blanc, le procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF ainsi que le procédé simultané, SSF sont testés. Pour ce faire les deux espèces de levures : *S. cerevisiae* et *S. shehatae* sont utilisées.

##### 4.2.4.1. Procédé séquentiel, SHF

L'hydrolyse des échantillons de son de blé désamidonné ou ceux du saule blanc non traités ou prétraités par les cellulases de *T. reesei* (1 g/L) et les xylanases de *T. longibrachiatum* (3 g/L) est conduite à 30°C pendant 80 h sous agitation (150 rpm). Deux cent milligrammes de son de blé désamidonné ou du saule blanc sont transvasés dans des fioles d'erenmeyer de 50 mL contenant 8 mL de tampon acétate ( $V_T = 10$  mL). Afin d'aboutir à des concentrations de 1 g/L en cellulases et 3 g/L en xylanases, 1 mL de cellulases préparées en tampon acétate (10 g/L) et 1 mL de xylanases en tampon acétate (30 g/L) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après arrêt de la réaction enzymatique par autoclave (121°C, 20 min), 1 mL du milieu YM concentré est ajouté et les cultures de levures sont inoculées avec 0,2 mL de préculture de *S. cerevisiae* ou *S. shehatae* de 16 h en milieu YM glucose. Chaque condition est répétée deux fois. Différents prélèvements sont réalisés au cours du temps afin de suivre l'évolution de la croissance des levures (mesures de  $DO_{600nm}$ ) ainsi que la concentration des sucres et de l'éthanol dans les milieux.

##### 4.2.4.2. Procédé simultané, SSF

La SSF des échantillons de son de blé désamidonné ou de saule blanc prétraités ou non est réalisée à 30°C sous agitation dans des erlens de 50 mL contenant 7 mL du tampon acétate, 1 mL du milieu YM concentré stérilisées par autoclave (121°C, 20 min). Après ajout de 1 mL de cellulases (à 10 g/L) et de 1 mL de xylanases (à 30 g/L), stérilisées par filtration (0,2  $\mu$ m), les milieux réactionnels sont incubés pendant 30 min à 30°C sous agitation. Après ce temps, les cultures de *S. cerevisiae* ou *S. shehatae* sont inoculées avec 0,2 mL de préculture de 16 h en YM glucose. La SSF est réalisée à 30°C en deux répétitions pour chaque condition.

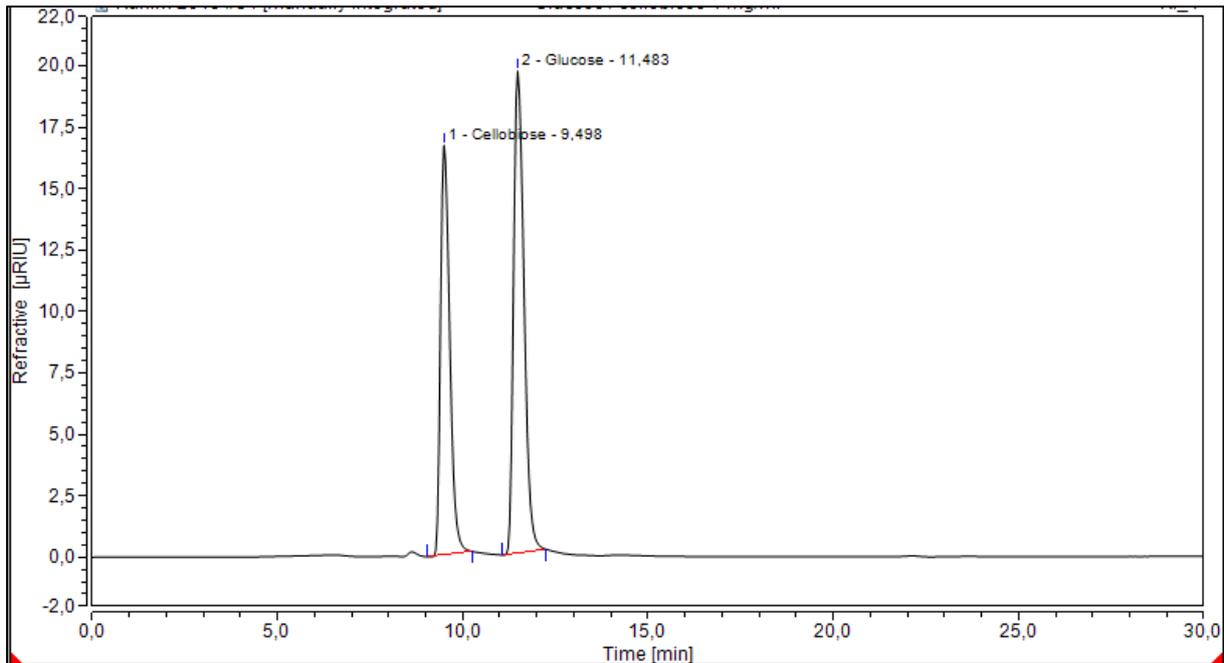
## **5. Caractérisation de la croissance de levures par mesure de densité optique**

Dans notre étude, les mesures de densité optique à 600 nm sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1800, le blanc étant l'eau distillée. Pour chaque mesure, des dilutions avec de l'eau distillée ont été effectuées au dixième ou au centième si la valeur de DO est supérieure à 1.

## **6. Quantification des sucres solubles et de l'éthanol par HPLC**

La quantification de la teneur en sucres et en éthanol est déterminée par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sur un équipement ThermoFisher Ultimate 3000 Basic couplée à un réfractomètre ; la phase stationnaire est une colonne HyperREZ XP Carbohydrate à contre-ion H<sup>+</sup> (300 x 7,7 mm) disposant d'une matrice à base de copolymère styrène sulfoné-di-vinylbenzène, maintenue à 65°C et une précolonne (50 x 7,7 mm) maintenue à 40°C. L'élution a été effectuée avec de l'eau ultra pure dégazée à un débit de 0,6 mL/min. Le réfractomètre en sortie de la HPLC mesure la variation d'indice de réfraction entre la phase mobile contenant le soluté et la phase mobile pure correspondant à la référence et génère des pics selon les différents produits qu'il détecte dans l'échantillon. La sensibilité est d'autant plus grande que la différence d'indice de réfraction des solutés à séparer et de la phase mobile est grande et le changement de l'intensité lumineuse est proportionnel à la concentration et à l'indice de réfraction de la solution échantillon. L'identification des pics suivant leur temps de rétention sur la colonne et le calcul de l'aire des pics sont réalisés par le logiciel (Chroméléon 7,0).

Le volume injecté était de 20 µL et le temps d'analyse par échantillon de 30 min. Les échantillons sont dilués puis filtrés sur 0,22 µm. La quantification des sucres et d'éthanol est basée sur des courbes d'étalonnage établies à l'aide des solutions standard de glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose, xylitol, cellobiose et d'éthanol réalisées sur 5 points compris entre 2 et 20 g/L, préparées isolément. La **Figure II.6** illustre un exemple de chromatogramme obtenu expérimentalement.



**Figure II.6.** Chromatogramme obtenu expérimentalement montrant la séparation de deux sucres : le cellobiose et le glucose

Les calculs du rendement maximal théorique en éthanol exprimé en pourcentage et obtenu par fermentation du glucose (ou hexose) sont calculés selon la formule suivante (1) alors que les rendements massiques ont été déterminés selon l'équation (2) :

$$Y \text{ éthanol (\%)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \left(\frac{g}{L}\right)}{[\text{glucose initial}] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,511} \times 100 \quad (1)$$

$$Y \text{ éthanol (g/g)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \left(\frac{g}{L}\right)}{[\text{glucose initial}] \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (2)$$

Le facteur 0,511 rend compte du rendement maximal théorique de fermentation du glucose en éthanol (0,511 g éthanol/g glucose) calculé selon l'équation suivante (3) :

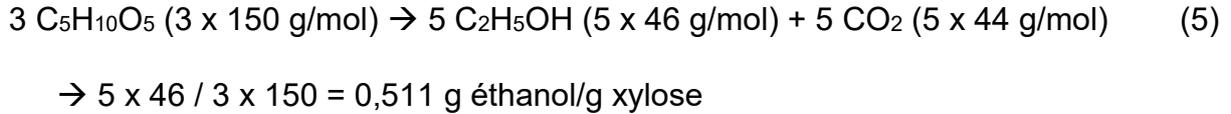


$$\rightarrow 2 \times 46 / 180 = 0,511 \text{ g éthanol/g glucose}$$

Les calculs de rendement en éthanol obtenu par fermentation du xylose sont calculés selon la formule suivante (4) :

$$Y \text{ éthanol (\%)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \left(\frac{g}{L}\right)}{[\text{xylose initial}] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,511} \times 100 \quad (4)$$

Le facteur 0,511 rend compte du rendement maximal théorique de fermentation du xylose en éthanol (0,511 g éthanol/g xylose) calculé selon l'équation (5) :



Le rendement de l'éthanol à partir de la cellulose en tant que substrat est calculé d'après l'équation suivante (6) :

$$Y \text{ éthanol (\%)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \text{ (g/L)}}{[\text{cellulose initiale}] \text{ (g/L)} \times 0,511 \times 1,11} \times 100 \quad (6)$$

Le facteur 0,511 correspond au rendement maximal théorique de fermentation du glucose en éthanol, et le facteur 1,11 au rendement d'hydrolyse de la cellulose en glucose sachant que la masse du glucose libre = 180 g/mol et celle du glucose polymérisé au sein de la cellulose = 162 g/mol  $\rightarrow 180/162 = 1,11$  g glucose/ g cellulose).

Le rendement de l'éthanol à partir du xylane en tant que substrat est calculé d'après l'équation suivante (7) :

$$Y \text{ éthanol (\%)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \text{ (g/L)}}{[\text{xylane initial}] \text{ (g/L)} \times 0,511 \times 1,14} \times 100 \quad (7)$$

Le facteur 0,511 correspond au rendement maximal théorique de fermentation du xylose en éthanol, et le facteur 1,14 au rendement d'hydrolyse du xylane en xylose sachant que la masse du xylose libre = 150 g/mol et celle du xylose polymérisé au sein du xylane = 132 g/mol  $\rightarrow 150/132 = 1,14$  g xylose/g xylane.

De plus, la conversion des échantillons lignocellulosiques en éthanol sont déterminés en tenant compte du pourcentage de cellulose ou du xylane dans chaque substrat lignocellulosique, selon les équations suivantes (8) et (9) :

$$Y \text{ éthanol (\%)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \text{ (g/L)}}{[\text{biomasse initiale}] \text{ (g/L)} \times \% \text{ cellulose} \times 0,511 \times 1,11} \times 100 \quad (8)$$

$$Y \text{ éthanol (\%)} = \frac{[\text{éthanol produit}] \text{ (g/L)}}{[\text{biomasse initiale}] \text{ (g/L)} \times \% \text{ xylane} \times 0,511 \times 1,14} \times 100 \quad (9)$$

Par ailleurs, la conversion de la cellulose modèle en glucose est calculée comme décrit dans l'équation suivante (10) :

$$Y_{\text{glucose}} (\%) = \frac{[\text{glucose produit}] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,9}{[\text{cellulose initiale}] \left(\frac{g}{L}\right)} \times 100 \quad (10)$$

Le facteur 0,9 tient compte de la différence entre la masse molaire du glucose libre (180 g/mol) et celle du glucose polymérisé au sein des fibres de cellulose (162 g/mol).

De même, la conversion du xylane en xylose est déterminée en appliquant la formule suivante (11) et en tenant compte du facteur 0,88 (132/150) où 132 correspond à la masse molaire du xylose polymérisé au sein du xylane et 150 à celle du xylose libre :

$$Y_{\text{xylose}} (\%) = \frac{[\text{xylose produit}] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,88}{[\text{xylane initial}] \left(\frac{g}{L}\right)} \times 100 \quad (11)$$

En outre, la conversion des échantillons lignocellulosiques en glucose ou xylose sont déterminés en tenant compte du pourcentage de la cellulose ou du xylane dans chaque substrat lignocellulosique, selon les équations suivantes (12) et (13) :

$$Y_{\text{glucose}} (\%) = \frac{[\text{glucose produit}] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,9}{[\text{biomasse initiale}] \left(\frac{g}{L}\right) \times \% \text{ cellulose}} \times 100 \quad (12)$$

$$Y_{\text{xylose}} (\%) = \frac{[\text{xylose produit}] \left(\frac{g}{L}\right) \times 0,88}{[\text{biomasse initiale}] \left(\frac{g}{L}\right) \times \% \text{ xylane}} \times 100 \quad (13)$$

## **7. Composition chimique des substrats lignocellulosiques**

La composition chimique des substrats lignocellulosiques est déterminée en appliquant la méthode de Van Soest (Van Soest, 1963 ; Van Soest *et al.*, 1991), reposant sur la différence de solubilité des constituants des parois végétales dans deux types de détergents. Les parois végétales peuvent se diviser en contenus cellulaires solubles incluant des sucres comme l'amidon, des protéines, des lipides,

des tannins, et des vitamines et en fibres insolubles correspondant principalement à l'hémicellulose, la cellulose et la lignine.

La méthode de Van Soest sépare ces deux types de composants cellulaires des parois végétales par l'utilisation de deux détergents : un détergent neutre à base d'éthylène diamine tétraacétique de sodium (EDTA), NDF (Neutral Detergent Fiber), et un détergent acide à base de bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (CTAB) et d'acide sulfurique dilué, ADF (Acid Detergent Fiber).

Un gramme de son de blé désamidonné ou de saule blanc broyé et séché est ajouté à 100 mL du détergent neutre NDF avec 0,5 g de sulfite de sodium et 2 mL de décahydronaphtalène, 98% (mélange d'isomères cis et trans) comme antimoussant. Le mélange est porté à ébullition (110°C) selon un chauffage à reflux sous une agitation vigoureuse pendant 1 h. Le mélange est ensuite filtré sous vide sur un fritté (porosité numéro 2) tout en lavant la fraction solide récupérée à l'eau bouillante puis à l'acétone. Le fritté est séché à l'étuve à 105°C pendant 8 h puis pesé après refroidissement ( $P_{NDF}$ ). Ensuite, le résidu NDF correspondant aux fibres insolubles (hémicellulose, cellulose et lignine) est incubé dans 100 mL du détergent acide (ADF) avec 0,5 g de sulfite de sodium et 2 mL de décahydronaphtalène, 98% jusqu'à ébullition pendant 1 h sous agitation. Le mélange est filtré sur fritté et rincé à l'eau bouillante puis à l'acétone. Après 8 h de séchage à l'étuve, l'échantillon est pesé ( $P_{ADF}$ ). Le résidu ADF correspondant à la cellulose et à la lignine est ensuite incubé avec 2 mL d'une solution d'acide sulfurique à 72% pendant 3 h à température ambiante sous agitation. Le mélange est ensuite filtré sur filtre de 0,45 µm de porosité et lavé à l'eau bouillante puis à l'acétone. La fraction solide placée dans un creuset pesé au préalable est séchée à l'étuve pendant 8 h puis pesée ( $P_{ADL}$ ). Le résidu ADL correspondant à la lignine et aux cendres placé dans un creuset en porcelaine est introduit dans un four à une température de 550°C pendant au moins 4 h (calcination à 550°C) puis refroidi dans un dessiccateur et pesé ( $P_{cendres}$ ). Pour chaque substrat lignocellulosique, quatre répétitions ont été réalisées.

### 7.1. Teneur en hémicellulose

La teneur en hémicellulose est calculée par l'équation suivante (14) :

$$\text{Hémicellulose (\%)} = \frac{(P_{NDF} - P_{ADF}) (g)}{\text{masse échantillon (g)}} \times 100 \quad (14)$$

## 7.2. Teneur en cellulose

La teneur en cellulose est calculée par l'équation suivante (15) :

$$Cellulose (\%) = \frac{(P\ ADF - P\ ADL) (g)}{masse\ échantillon (g)} \times 100 \quad (15)$$

## 7.3. Teneur en lignine

La teneur en lignine est calculée par l'équation suivante (16) :

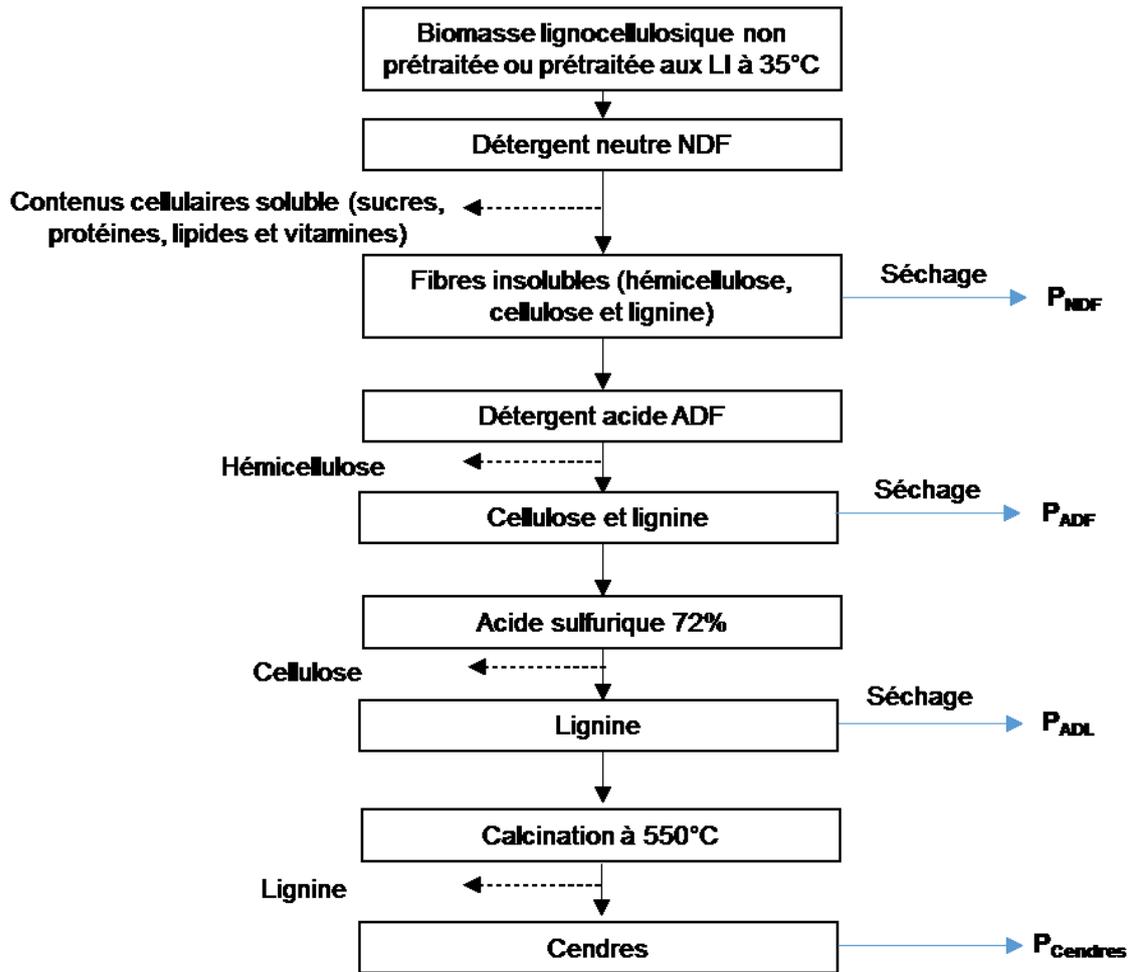
$$Lignine (\%) = \frac{(P\ ADL - P\ Cendres) (g)}{masse\ échantillon (g)} \times 100 \quad (16)$$

## 7.4. Teneur en cendres

La teneur en cendres est calculée par l'équation suivante (17) :

$$Cendres (\%) = \frac{P\ Cendres (g)}{masse\ échantillon (g)} \times 100 \quad (17)$$

Le principe général de la détermination de composition des substrats lignocellulosiques par la méthode de Van Soest est illustré dans la **Figure II.7**.



**Figure II.7.** Principe de la détermination de la composition chimique des substrats lignocellulosiques par la méthode de Van Soest (d'après Van Soest, 1963 et Van Soest *et al.*, 1991)

## 8. Caractérisation structurale des substrats (ligno)cellulosiques par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

Les spectres de spectroscopie infrarouge ont été réalisés sur des échantillons de cellulose longues fibres, de sciure de chêne et d'épicéa, non prétraités et prétraités à l'[Emim][OAc] (40 min à 45°C) grâce à un spectromètre à transformée de Fourier Shimadzu FT-IR 8400S disposant d'une cellule à réflexion totale atténuée (ATR) constituée d'un cristal de sélénure de zinc pour le dépôt des échantillons. Les spectres sont enregistrés dans le domaine du moyen infrarouge (entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$ ) avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  pour 128 scans. Afin d'homogénéiser les spectres, un traitement spectral à travers la correction de la ligne de base a ensuite été appliqué à tous les spectres obtenus. Aucun lissage ni normalisation n'ont été réalisés.

## **9. Caractérisation morphologique des substrats (ligno)cellulosiques**

Les échantillons de cellulose longues fibres et ceux de sciures de chêne et d'épicéa ont été métallisés à l'or avec une épaisseur de 5 nm à l'aide d'un appareil de revêtement par pulvérisation rotative (Quorum Q150RS). Les échantillons ont ensuite été observés par Microscopie électronique à balayage (MEB) sous vide poussé en utilisant un détecteur électronique secondaire.

# *Résultats et Discussion*

# Chapitre III

*Etude de la production de  
bioéthanol par des levures à  
partir des substrats  
glucidiques constitutifs de la  
biomasse lignocellulosique*

## 1. Introduction

Dans ce premier chapitre, l'étude de la fermentation éthanolique de différents substrats glucidiques, éventuellement présents dans les hydrolysats de la BLC, a été abordée sur quatre espèces différentes de levures sauvages : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces shehatae* et *Scheffersomyces stipitis*.

Le principal objectif de ce travail étant la valorisation de la cellulose (homopolymère de glucose) et des hémicelluloses (hétéropolymères incluant majoritairement du xylose, arabinose, glucose, mannose et galactose) en bioéthanol de 2G, la fermentation des hexoses et également des pentoses est donc envisagée. C'est pourquoi le choix de ces quatre levures a été basé sur ce qui est rapporté dans la littérature : *S. cerevisiae* et *K. marxianus* sont deux levures modèles de fermentation des hexoses (Bai *et al.*, 2008 ; Fonseca *et al.*, 2008 ; Olofsson *et al.*, 2008a et b ; Gírio *et al.*, 2010 ; Fonseca *et al.*, 2013 ; Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018) alors que *S. shehatae* et *S. stipitis* sont capables de fermenter les pentoses (Ligthelm *et al.*, 1988 ; Du Preez *et al.*, 1989a et b ; Günan Yücel and Aksu, 2015). Concernant la fermentation du xylose, la plupart des espèces de levures décrites capables de le consommer montrent pourtant une production faible d'éthanol voire négligeable. Cependant, plusieurs espèces ont été rapportées produire plus de 1 g/L d'éthanol à partir de la fermentation de 20 g/L du xylose : *Brettanomyces naardenensis*, *Scheffersomyces (Candida) shehatae*, *Candida tenuis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia segobiensis*, et *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* (Toivola *et al.*, 1984). Parmi les espèces citées ci-dessus, les deux levures *S. shehatae* et *S. stipitis* produisent les meilleurs rendements éthanoliques à partir du xylose (Du Preez and van der Walt, 1983 ; Bruinenberg *et al.*, 1984 ; Du Preez, 1994 ; Prior *et al.*, 1989 ; Antunes *et al.*, 2014 ; Slininger *et al.*, 2015), c'est pourquoi elles ont été sélectionnées dans cette étude.

Les cultures des levures ont été effectuées sur milieu YM (extrait de malt, extrait de levure et peptone) additionné soit d'un sucre simple, un hexose (D-glucose, D-mannose ou D-galactose) ou un pentose (D-xylose, D-arabinose ou L-arabinose), soit d'un mélange de deux ou trois de ces sucres. Le xylitol, un pentitol qui peut être converti en xylulose lors du catabolisme du xylose, a été aussi testé, en se basant sur

certaines études qui ont rapporté que *S. cerevisiae* est capable de fermenter le xylulose, un intermédiaire du catabolisme du xylose, via la voie des pentoses phosphates (Gong *et al.*, 1983 ; Dellomonaco *et al.*, 2010 ; Ha *et al.*, 2011). Dans le cas des deux levures *S. cerevisiae* et *K. marxianus*, les cultures ont été également menées sur mélange de trois hexoses comprenant le glucose, le galactose et le mannose, afin d'étudier l'effet du glucose sur l'assimilation des autres hexoses en mélange. D'autre part, un mélange de xylose et glucose a été ajouté aux milieux de culture de *S. shehatae* et *S. stipitis* pour examiner l'effet du glucose sur la consommation du xylose par ces deux levures. De plus, dans le cas de *S. shehatae*, des cultures sont aussi réalisées sur un mélange de xylose et xylitol.

Le but de ces études est d'étudier la capacité de ces quatre levures sélectionnées de fermenter les différents monosaccharides constitutifs de la BLC et de comparer leurs rendements éthanoliques.

De plus, l'assimilation de ces différents hexoses et pentoses par les levures a été étudiée en conditions aérobies et également en conditions anaérobies pour tester l'effet de l'oxygène sur la croissance et sur la fermentation éthanolique de ces sucres.

Plus tard dans ce chapitre, les cultures des quatre levures ont également été réalisées sur le cellobiose, un dimère de glucose (liées en  $\beta$ -1,4) ; le but étant de tester la capacité de ces levures à fermenter le cellobiose, un produit intermédiaire de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose qui peut être accumulé dans les hydrolysats enzymatiques de la (ligno)cellulose en raison de la faible teneur et/ou activité de la  $\beta$ -glucosidase dans le mélange cellulolytique provenant des champignons sauvages (Blondin *et al.*, 1982 ; Ryabova *et al.*, 2003 ; Ha *et al.*, 2011).

Enfin, l'effet de la présence dans le milieu de culture, de faibles concentrations en LI : l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur les levures est évalué soit en réalisant des cultures en fioles d'erlenmeyer (VT=50 mL), soit en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide (VT=1 mL).

## 2. Cultures des levures sur hexoses

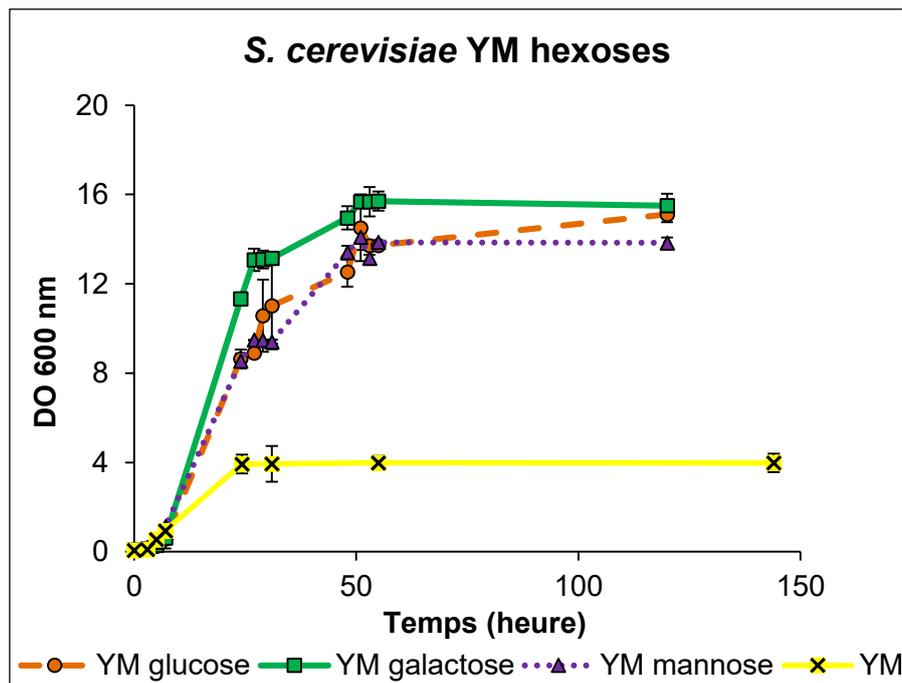
### 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levure modèle traditionnelle *Saccharomyces cerevisiae* est la plus utilisée dans les processus technologiques de fermentation éthanolique vu ses rendements éthanoliques élevés (entre 90 et 93% du rendement maximal théorique) et sa forte tolérance à l'éthanol (~ 5% v/v), produit majeur de fermentation (You *et al.*, 2003 ; Chandler *et al.*, 2004 ; Bai *et al.*, 2008 ; Stanley *et al.*, 2010 ; Zabed *et al.*, 2016).

#### 2.1.1. Conditions aérobies

##### 2.1.1.1. Sur glucose, galactose ou mannose

Les mesures spectrophotométriques ont permis d'évaluer la croissance de *S. cerevisiae* YSC2 Type II en milieu YM glucose, mannose ou galactose et sont représentées en **Figure III.1**.

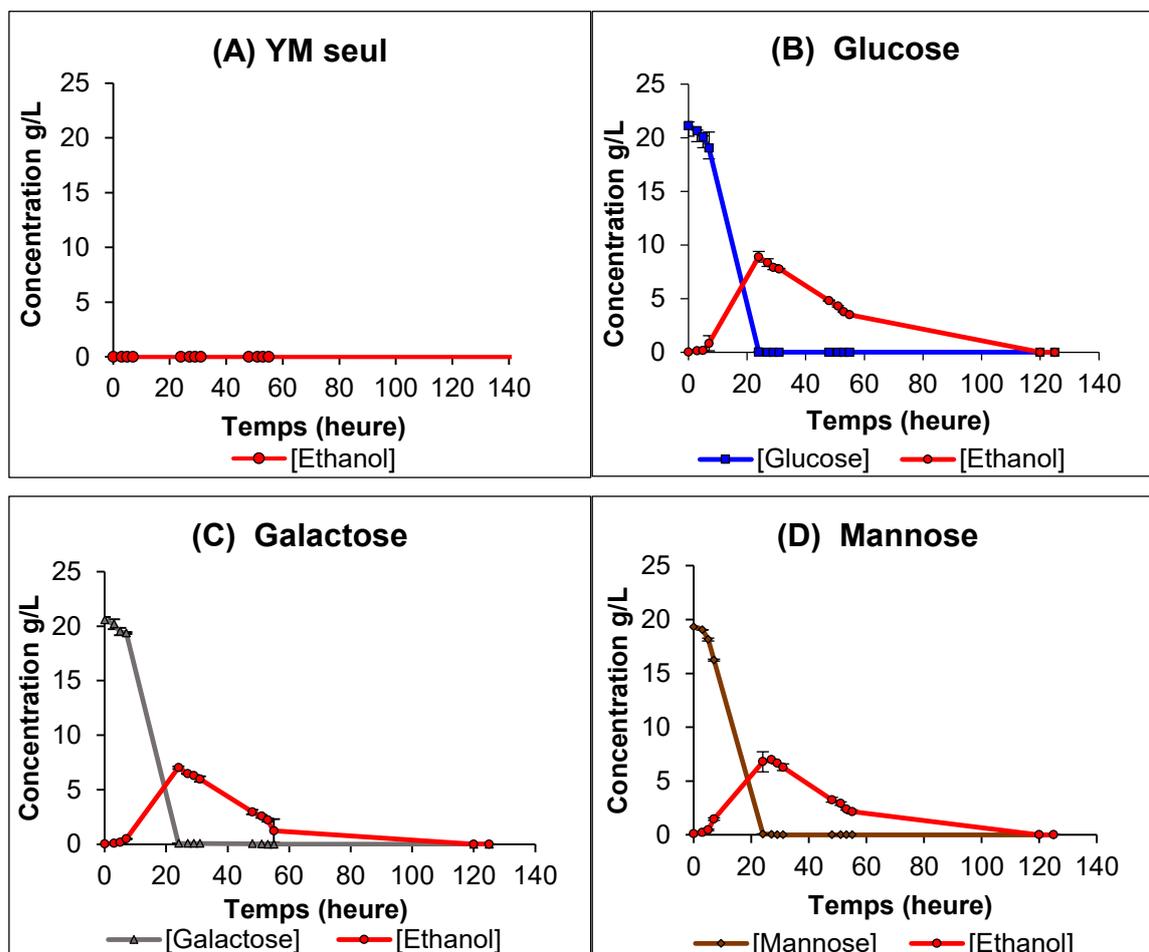


**Figure III.1.** Suivi de la croissance de *S. cerevisiae* en YM seul, YM glucose, YM galactose et YM mannose à 30°C en aérobiose

Ces résultats ont montré que la croissance de *S. cerevisiae* est aussi importante sur le glucose que sur le mannose ou le galactose en montrant des DO<sub>600nm</sub> maximales très proches : 14,5 (à 51 h) en YM glucose, 15,7 (à 51 h) en YM galactose et 14,1 (à 51 h) en YM mannose. Cette croissance est considérée importante relativement à celle

observée dans le cas contrôle sur le milieu YM seul sans sucre où la  $DO_{600nm}$  maximale est de  $4,0 (\pm 0,3)$ .

Les résultats du dosage du sucre (glucose, galactose ou mannose) par HPLC, présentés dans la **Figure III.2** montrent qu'après 24 h, il y a eu consommation totale de chacun de ces trois hexoses, le glucose, le galactose et le mannose.



**Figure III.2.** Dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. cerevisiae* en YM seul (A), YM glucose (B), YM galactose (C) et YM mannose (D) à 30°C en aérobiose

La concentration de l'éthanol produit a été aussi quantifiée (**Figure III.2**). La levure *S. cerevisiae* produit de l'éthanol en même temps qu'elle consomme le glucose, le galactose ou le mannose mais aucune production d'éthanol n'est détectée sur milieu YM seul sans sucre (**Figure III.2 A**). Le maximum d'éthanol est produit à 24 h quand le sucre est complètement métabolisé. Ainsi, dans le milieu YM contenant du glucose, du galactose ou du mannose, la concentration maximale d'éthanol mesurée est de 8,9 g/L, 7,0 g/L et 7,0 g/L, respectivement.

Après l'épuisement du sucre dans le milieu de culture, il n'y a plus d'augmentation de la concentration d'éthanol ce qui indique que chacun de ces trois hexoses est le seul substrat pour la production d'éthanol dans le milieu YM hexoses. Les autres composants du milieu tels que les peptones, l'extrait de levure et l'extrait de malt ne peuvent pas servir comme substrats pour la production d'éthanol, mais ils peuvent contribuer à la croissance des levures (voir YM seul en **Figure III.1**). Au-delà de 24 h, la concentration d'éthanol diminue dans le milieu de culture pour s'annuler après 120 h. Cette diminution de la concentration d'éthanol est due à sa consommation par les levures après l'épuisement du sucre. La levure *S. cerevisiae* consomme l'éthanol produit, après épuisement de sucre, en tant que source de carbone en le convertissant en acétaldéhyde puis en acétyl coenzyme A qui rejoint le cycle de Krebs (Bennetzen and Hall, 1982).

La production de l'éthanol par *S. cerevisiae* à partir du glucose, du galactose ou du mannose correspond respectivement à des rendements éthanologiques de 87,2%, 68,7% et 68,3%. Ces résultats permettent de constater que même en aérobiose, la métabolisation de ces trois sucres fait intervenir à la fois la respiration et la fermentation chez la levure *S. cerevisiae*, conformément à la littérature qui décrit cette levure comme Crabtree positive (Weusthuis *et al.*, 1994 ; Lei *et al.*, 2001). En effet, *S. cerevisiae* montre une grande sensibilité vis-à-vis du sucre, particulièrement le glucose présent dans le milieu. Si ce dernier est en excès (concentration supérieure à 1 g/L) en milieu aéré, le métabolisme de la levure est basculé d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme respiro-fermentaire (Ratledge, 1991). Les rendements éthanologiques obtenus par la souche de *S. cerevisiae* utilisée dans notre étude sont comparables avec ceux rapportés dans d'autres études. En effet, Vallet *et al.* (1996) ont rapporté un rendement éthanologique de 90% à partir de 20 g/L de glucose par *S. cerevisiae* 27817. De même, Yu and Zhang (2004) ont trouvé un rendement de 90,4% d'éthanol à partir du glucose par *S. cerevisiae* 2.399 (étude réalisée en fioles d'erlenmeyer de 150 mL, le volume réactionnel étant de 100 mL). Par ailleurs, un rendement en éthanol de 85,6% à partir du glucose a été rapporté par Navarro *et al.* (2000) en utilisant *S. cerevisiae* CMI237 (étude réalisée en fioles d'erlenmeyer de 1 L avec un milieu de fermentation de 500 mL), alors qu'un rendement inférieur de 62,6% par *S. cerevisiae* 24860 a été mentionné par Najafpour *et al.* (2004) (étude effectuée dans un bioréacteur de volume réactionnel de 740 mL). Par ailleurs, Rouhollah *et al.* (2007) ont

trouvé une conversion en éthanol de 79,3, 71,2 et 66,5% à partir du glucose, du mannose et du galactose (dans des fioles d'erlenmeyer de 250 mL, le volume du milieu de fermentation étant 100 mL), respectivement, ce qui est en accord avec nos résultats qui montrent une meilleure production d'éthanol par *S. cerevisiae* à partir du glucose en comparaison avec le mannose ou le galactose. Cependant, les travaux de Da Cruz *et al.* (2003) ont indiqué que *S. cerevisiae* Fiso génère un rendement en éthanol de 52,2% à partir du galactose (étude effectuée en fioles d'erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu de fermentation), inférieur à celui obtenu dans notre étude (68,3%) et à celui de Rouhollah *et al.* (2007) (66,5%).

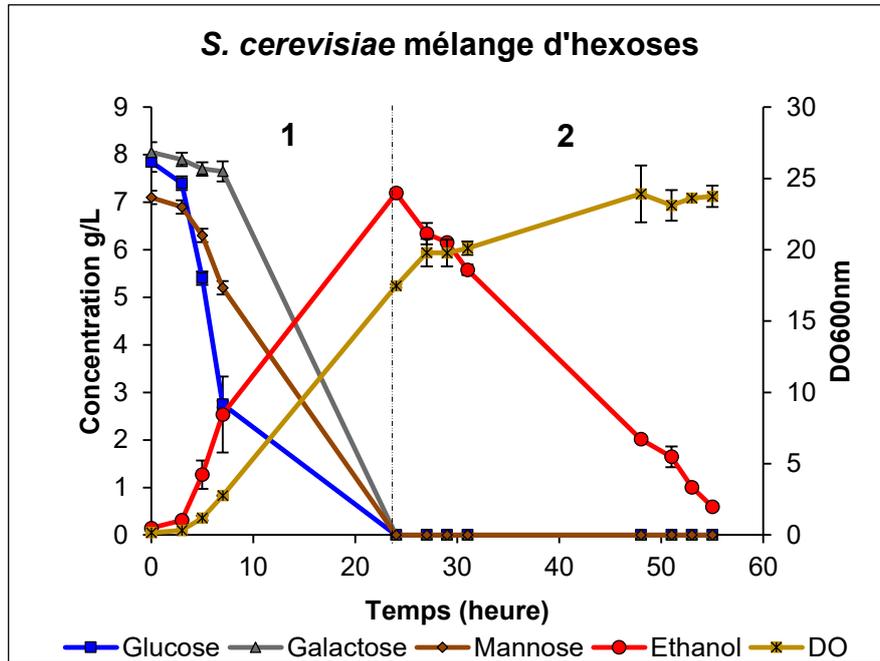
#### *2.1.1.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose*

Il a été rapporté que le glucose peut exercer un effet sur l'expression de gènes chez les levures principalement chez *S. cerevisiae* ; il inhibe l'induction des gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire comme les cytochromes et les enzymes permettant l'assimilation d'autres hexoses tels que le galactose, le mannose et le maltose (Johnston, 1999). Ceci illustre l'effet dominant du glucose sur les autres sources de carbone, désigné par la répression catabolique du glucose (Magasanik, 1961 ; Johnston, 1999).

Afin d'étudier l'effet du glucose sur l'utilisation des autres hexoses dans un mélange par *S. cerevisiae*, des cultures ont été réalisées en milieu YM + un mélange des 3 hexoses : le glucose, le galactose et le mannose avec une proportion égale de chacun (7 g/L). Ainsi, la concentration initiale en sucres dans le milieu est proche de 20 g/L.

Des prélèvements du milieu de culture ont été effectués à différents temps pour suivre la consommation de ces trois hexoses et la production d'éthanol par *S. cerevisiae*. Les mesures spectrophotométriques de DO ainsi que les analyses des concentrations des hexoses et d'éthanol en aérobiose sont regroupés dans la **Figure III.3**. Les concentrations des 3 sucres dans le milieu à 7 h sont 2,8 g/L, 5,2 g/L et 7,6 g/L correspondant aux concentrations du glucose, du mannose et du galactose, respectivement. Ces résultats ont montré que le glucose est consommé plus rapidement que le mannose et le galactose dont la consommation était la plus lente, conformément à la littérature (Van Maris *et al.*, 2006). Ainsi, la levure *S. cerevisiae*

consomme le glucose d'une manière préférentielle par rapport aux deux autres sucres dans le mélange.



**Figure III.3.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* et dosage de sucres et d'éthanol sur milieu YM + mélange d'hexoses à 30°C en aérobiose

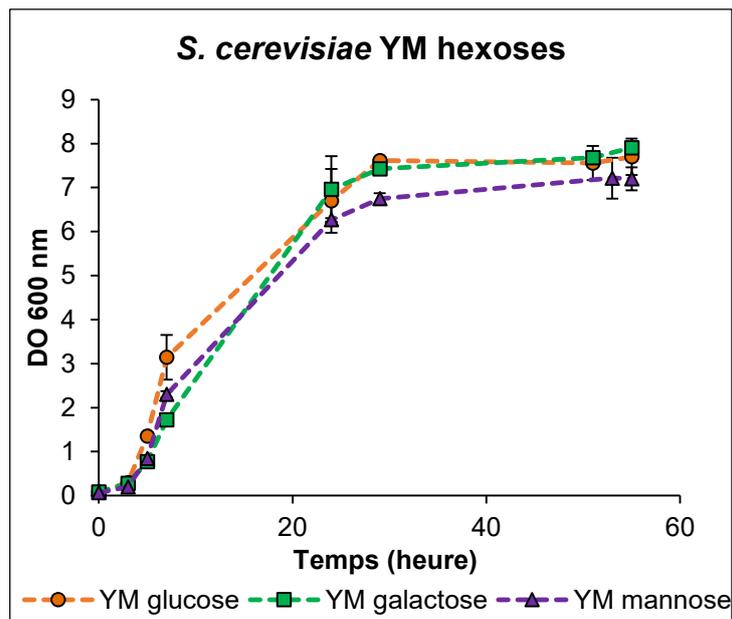
La production d'éthanol est maximale à 24 h quand tous les sucres sont épuisés, atteignant une valeur de 7,2 g/L. Au-delà de 24 h, cette concentration diminue progressivement car l'éthanol est consommé par la levure.

Comme montré sur la **Figure III.3**, l'évolution de la DO<sub>600nm</sub> est bien en corrélation avec les résultats du dosage des sucres. La courbe de croissance peut être divisée en 2 grandes phases ; la phase (1) (de 5 jusqu'à 24 h) qui correspond à la phase de croissance de la levure montrant l'assimilation des trois sucres dans le mélange et la phase (2) (de 24 h jusqu'à 55 h) où la levure continue à croître mais plus légèrement et ceci en consommant l'éthanol produit. Par ailleurs, il est à signaler que la présence simultanée des 3 hexoses à une concentration de 20 g/L dans le milieu a conduit à une DO maximale (23,9) supérieure à celle observée sur milieux contenant 20 g/L de chaque hexose séparément (DO maximale autour de 15).

## 2.1.2. Conditions anaérobies

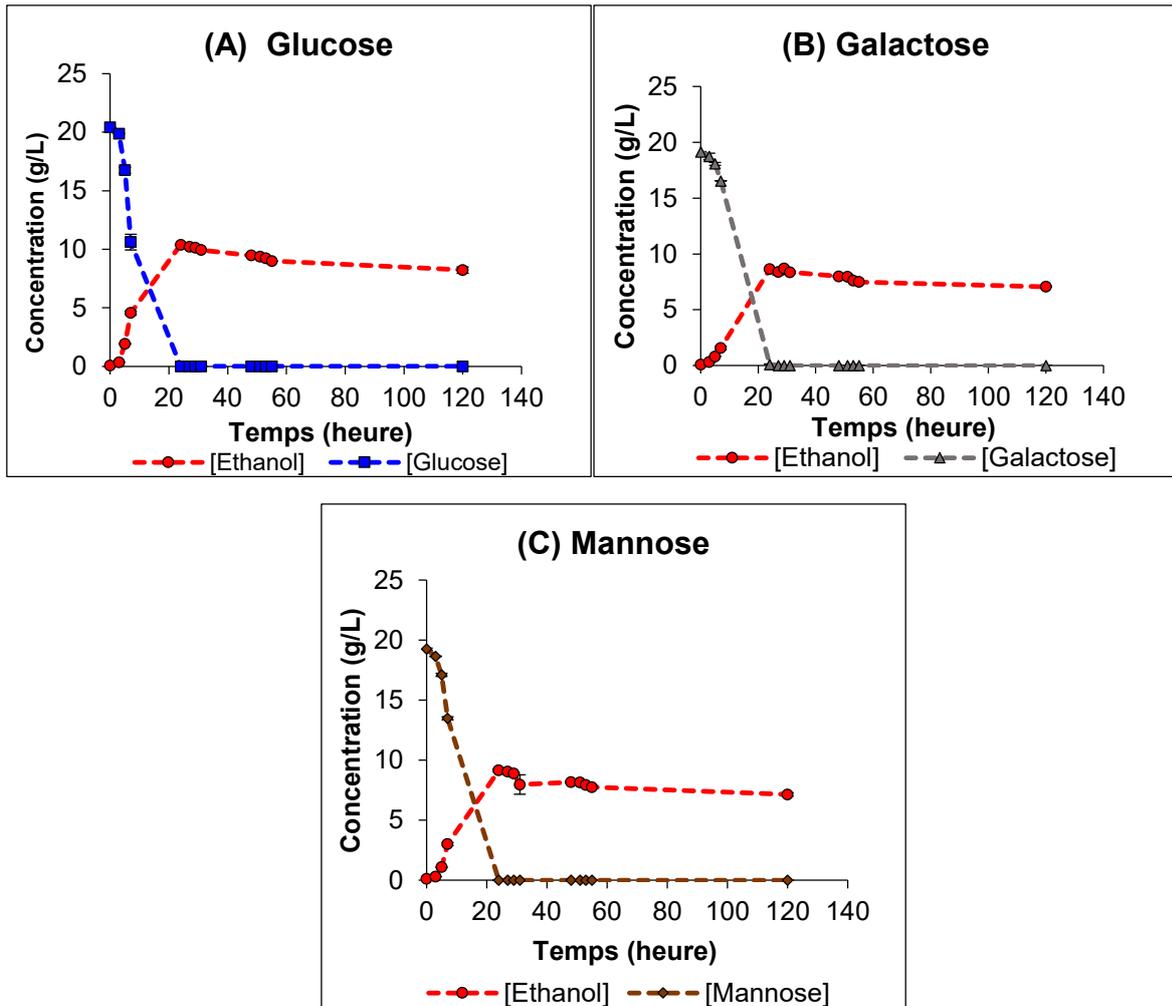
### 2.1.2.1. Sur glucose, galactose ou mannose

Dans le but de tester l'effet des conditions anaérobies sur la croissance de la levure *S. cerevisiae* ainsi que sur la production d'éthanol à partir des trois hexoses, des cultures de *S. cerevisiae* sont cette fois menées dans des fioles à bouchons étanches limitant ainsi le transfert d'oxygène dans les milieux. Les trois hexoses sont comme précédemment : le D-glucose, le D-galactose ou le D-mannose à une concentration initiale de 20 g/L. Les valeurs de  $DO_{600nm}$  mesurées au cours du temps, reflétant la croissance des levures, ont montré qu'en conditions anaérobies la croissance des levures est plus faible. Les  $DO_{600nm}$  maximales sont respectivement de 8,1 à 53 h en YM glucose, 8,0 à 53 h en YM galactose et 7,2 à 53 h en YM mannose (**Figure III.4**). L'allure des trois courbes est similaire et les DO maximales sont proches sur les trois milieux de culture.



**Figure III.4.** Suivi de la croissance de *S. cerevisiae* en YM glucose, YM galactose et YM mannose à 30°C en conditions anaérobies

La croissance de *S. cerevisiae* en anaérobiose est moins importante qu'en aérobie et la levure en consommant chacun de ces hexoses produit plus d'éthanol que de masse cellulaire. Ceci est montré dans les résultats du dosage des sucres et de l'éthanol représentés en **Figure III.5**.



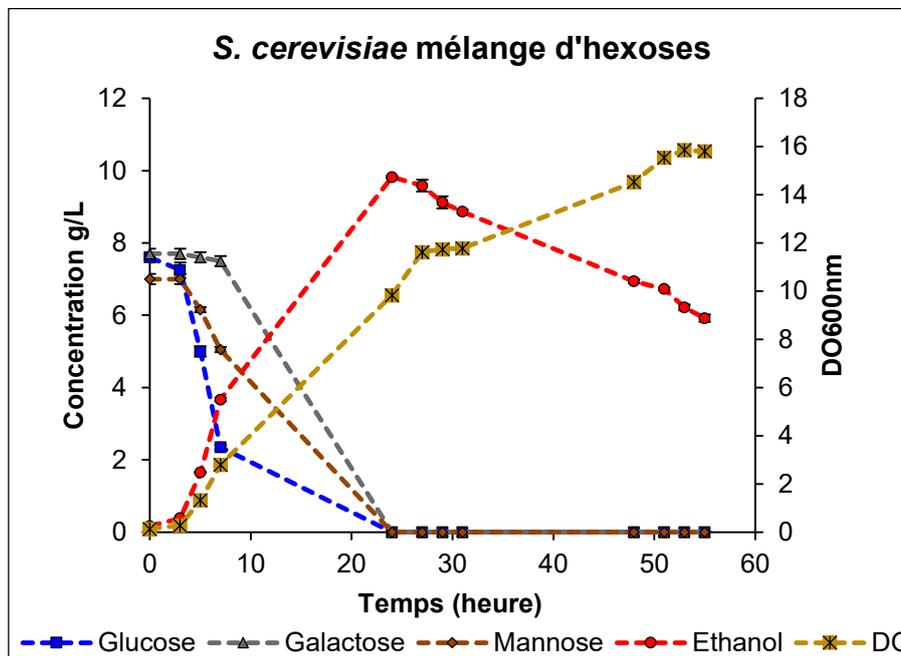
**Figure III.5.** Dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. cerevisiae* en YM glucose (A), YM galactose (B) et YM mannose (C) à 30°C en conditions anaérobies

Durant les premières vingt heures, les trois hexoses sont entièrement consommés par les levures simultanément à la production d'éthanol. En revanche, la production d'éthanol par la levure *S. cerevisiae* à partir des hexoses est plus importante qu'en aérobiose et les concentrations maximales d'éthanol obtenues sont respectivement 10,4 g/L en YM glucose, 8,6 g/L en YM galactose et 9,1 g/L en YM mannose (Figure III.5). Après l'épuisement du sucre dans le milieu, la concentration en éthanol ne diminue quasiment pas, ce qui permet de constater que dans ces conditions l'éthanol n'est pas consommé par les levures contrairement à ce qui a été observé en aérobiose. Il est remarquable que le meilleur rendement éthanolique a été obtenu à partir de l'utilisation du glucose comme source de carbone aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose par rapport au galactose et au mannose.

Ces résultats confirment le fait que les conditions anaérobies ou anaérobies stimulent la biosynthèse d'éthanol au dépend de la production de la biomasse (Barnett and Entian, 2005 ; Frick and Wittmann, 2005), ce qui explique les rendements éthanoliques plus élevés en anaérobiose (99,6% sur glucose, 85,1% sur galactose et 89,6% sur mannose) et la croissance plus faible. Cette augmentation des rendements en éthanol sous conditions anaérobies est en accord avec les travaux de Ligthelm *et al.* (1988) qui ont constaté que les rendements éthanoliques par *S. cerevisiae* NRRL Y-132 sur glucose ont augmenté de 70,5% en aérobie à 84,1% en anaérobiose. Toutefois, ces rendements obtenus par Ligthelm *et al.* (1988) et ceux par Flores-Cosio *et al.* (2018) : 89,0% à partir du glucose par *S. cerevisiae* ERD en conditions limités en oxygène glucose sont inférieurs à ceux obtenus dans notre étude (99,6%).

### 2.1.2.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose

En conditions anaérobies comme en aérobie, l'effet du glucose sur d'autres hexoses en mélange a été également étudié. Les résultats de l'évolution de la croissance, de la concentration des sucres et de l'éthanol sont représentés en **Figure III.6**.



**Figure III.6.** Cinétique de croissance de *S. cerevisiae* et dosage de sucres et d'éthanol sur milieu YM + mélange d'hexoses à 30°C en conditions anaérobies

Ces résultats sont similaires en termes d'allure des courbes et consommation des sucres à ceux observés en aérobie sauf que le maximum d'éthanol produit dans

ce cas est supérieur ayant une valeur de 9,8 g/L (contre 7,2 g/L en aérobiose). On note que sous conditions anaérobies, l'éthanol produit est légèrement consommé après épuisement des sucres et sa vitesse de consommation est faible comparée à celle en aérobiose. En effet, à 55 h, la concentration en éthanol sous conditions anaérobies est de 5,9 g/L (**Figure III.6**) alors qu'elle diminue jusqu'à 0,6 g/L en aérobiose (**Figure III.3**), sachant que le maximum d'éthanol mesuré est apparu à 24 h dans les deux cas.

D'une façon générale, on peut constater que l'anaérobiose aboutit à une amélioration de la production d'éthanol que ce soit à partir des sucres séparés : de +16,6, +22,9 et +31,1% sur glucose, galactose et mannose, respectivement ou en mélange : +36,6% par rapport à l'aérobiose.

En fait, l'oxygène joue un double rôle dans la physiologie des levures ; il est utilisé comme accepteur final d'électrons pour la respiration mitochondriale et aussi dans les réactions de biosynthèse comme par exemple de l'ergostérol et des acides gras insaturés nécessaires pour la croissance (Weusthuis *et al.*, 1994). C'est ainsi que sa concentration dans le milieu de culture est un paramètre important orientant le métabolisme de la levure et influençant sa croissance. Au vu de la littérature et au niveau métabolique, l'investissement de la levure *S. cerevisiae* dans la production d'éthanol au détriment de la biomasse cellulaire en anaérobiose ou sous limitation s'explique par le fait que la levure est privée de son accepteur final d'électrons (l'oxygène dissous). En effet, dans ces conditions, la fonction d'accepteur final d'électrons est assurée par les molécules organiques que la levure synthétise à partir de son substrat. La levure utilise d'abord le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide,  $NAD^+$ , comme accepteur intermédiaire d'électrons qui est ensuite réduit en  $NADH+H^+$  mais qui ne peut plus être ré-oxydé par la chaîne respiratoire en absence d'oxygène. La levure utilise donc un autre accepteur final d'électrons qui est l'acétaldéhyde dans le cas de *S. cerevisiae*. Ainsi, la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol et en dioxyde de carbone permet de ré-oxyder les cofacteurs  $NADH+H^+$  produits au cours de la glycolyse et par la suite de maintenir l'équilibre rédox (Bruinenberg, 1986 ; Van Dijken and Scheffers, 1986 ; Ratledge, 1991). Par conséquent, sous limitation d'oxygène, le glucose est métabolisé via la voie de l'éthanol plutôt que via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (comme décrit dans le chapitre I) impliquant ainsi une croissance des levures plus faible.

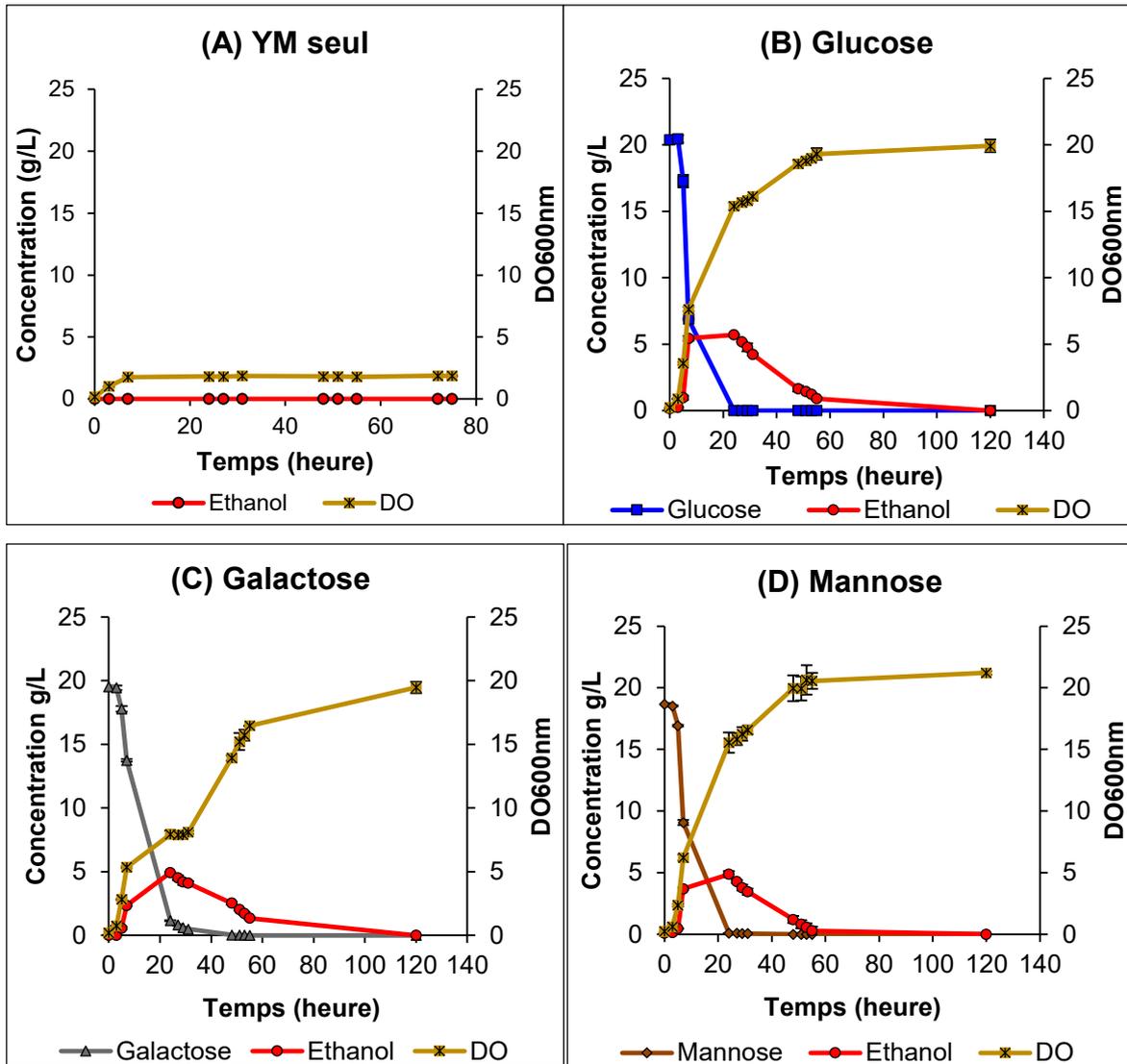
## 2.2. *Kluyveromyces marxianus*

Une deuxième levure modèle de fermentation des hexoses, *Kluyveromyces marxianus*, décrite pour sa thermotolérance, a été également étudiée. Cette levure paraît intéressante notamment si un procédé simultané d'hydrolyse enzymatique de BLC et de fermentation est envisagé. En effet, *K. marxianus* est décrite comme capable de se développer à des températures allant jusqu'à 52°C et de fermenter le glucose en éthanol à des températures relativement élevées comparée à *S. cerevisiae*, ce qui permettrait de mettre en œuvre un procédé simultané à des températures plus proches de l'activité optimale des cellulases (40 - 50°C) (Hari Krishna *et al.*, 2001 ; Ballesteros *et al.*, 2004 ; Fonseca *et al.*, 2008 ; Lin *et al.*, 2012). La souche *K. marxianus* UMIP 2234.94 utilisée dans cette étude présente un optimum de croissance et de production éthanolique à 35°C (non montré), c'est pour cela que les cultures de *K. marxianus* ont été réalisées à 35°C.

### 2.2.1. Conditions aérobies

#### 2.2.1.1. Sur glucose, galactose ou mannose

Les cultures de *K. marxianus* sur glucose, galactose ou mannose ont mené toutes les trois à des DO<sub>600nm</sub> maximales autour de 20 avec toutefois une croissance plus lente sur le galactose comme seule source de carbone (**Figure III.7**).



**Figure III.7.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *K. marxianus* en YM seul (A), YM glucose (B), YM galactose (C) et YM mannose (D) à 35°C en aérobiose

Les résultats de dosage des sucres et d'éthanol représentés en **Figure III.7**, montrent que les trois hexoses sont entièrement consommés en 24 h. La consommation du galactose par la levure est la plus lente comparée au glucose ou mannose. En effet, en considérant les dix premières heures de culture, les concentrations de ces trois hexoses sont différentes dans les milieux de culture et sont de 13,7 g/L, 9,1 g/L, et 6,8 g/L, respectivement pour le galactose, le mannose et le glucose au temps = 7 h.

Une production d'éthanol par la levure *K. marxianus* est notée à partir de ces trois hexoses. Les concentrations maximales en éthanol obtenues par *K. marxianus*

coïncident au moment de la disparition totale du sucre quel que soit ce dernier, similairement à ce qui était observé chez *S. cerevisiae*. En effet, on note un maximum d'éthanol de 5,7 g/L, 4,9 g/L et 4,9 g/L à partir du glucose, galactose et mannose, respectivement. Ces concentrations maximales en éthanol obtenues par *K. marxianus* à partir des hexoses sont inférieures à celles obtenues avec *S. cerevisiae*. En revanche, *K. marxianus* présente une croissance plus importante que *S. cerevisiae* dans les mêmes milieux. Après épuisement des sucres à 24 h, l'éthanol produit est consommé par les levures pour devenir nul après 120 h.

Ces observations quant à la croissance de *K. marxianus* ont également été constatées par Fonseca *et al.* (2013) sur une autre souche de *K. marxianus* CBS 6556, en culture sur différents sucres comme source de carbone et d'énergie. En effet, Fonseca et ses collaborateurs (2013) ont remarqué que la croissance de *K. marxianus* CBS 6556 était la plus lente sur le galactose comparé au glucose, fructose, lactose ou saccharose. Ils ont ainsi suggéré que l'assimilation du galactose paraît moins efficace que celle des autres sucres chez *K. marxianus* CBS 6556. La croissance plus lente observée sur le galactose pourrait être expliquée par le fait qu'il n'y a pas un système de transport spécifique pour le galactose qui est transporté par le même transporteur que le glucose (De Bruijne *et al.*, 1988). Ce dernier présente une affinité supérieure au glucose qu'au galactose, ce qui pourrait corroborer la croissance plus lente de la levure sur le galactose par rapport au glucose (De Bruijne *et al.*, 1988).

Il est à souligner que lors des cultures de *K. marxianus* CBS 6556 réalisées par Fonseca *et al.* (2013) sur le galactose, aucune concentration en éthanol n'a été détectée dans le milieu contenant initialement 10 g/L de ce sucre. Ces résultats différents pourraient être dus à la différence entre les souches de *K. marxianus* utilisées mais aussi à la concentration initiale en galactose. Cette différence de résultats entre notre étude et celle de Fonseca *et al.* (2013) a été encore rencontrée sur le glucose comme source de carbone. La production d'éthanol par la souche de *K. marxianus* CBS 6556 à partir du glucose à une teneur initiale de 10 g/L était de 0,1 g/L. Afin d'étudier l'influence de la concentration initiale en glucose et l'occurrence de la répression catabolique par le glucose, Fonseca et ses collaborateurs ont augmenté la concentration initiale en glucose de 10 à 20 g/L (comme dans notre cas) et ont trouvé que la concentration en éthanol a augmenté de 0,1 à 0,3 g/L. Ainsi, la souche de *K.*

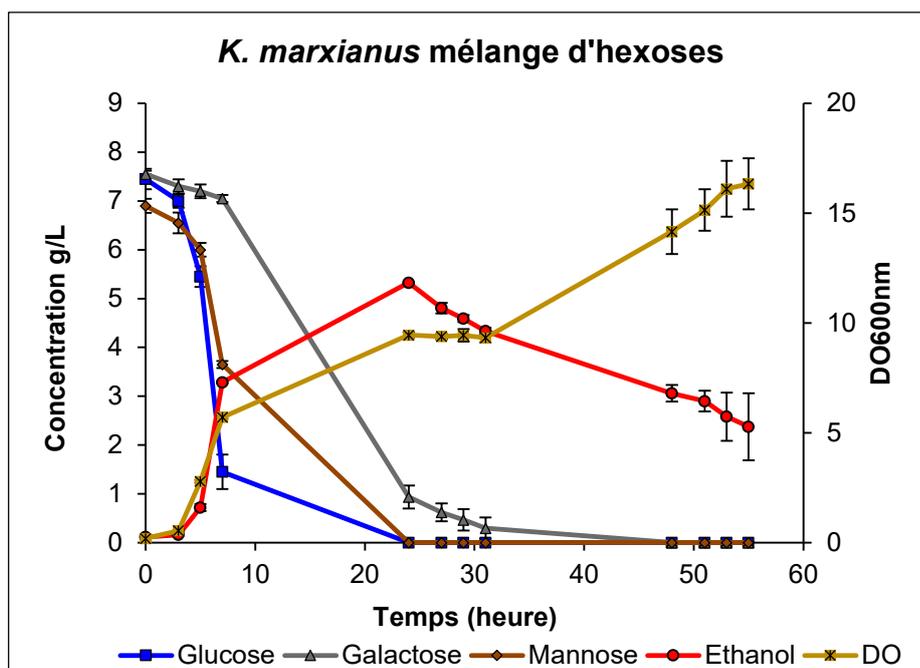
*marxianus* UMIP 2234.94 employée dans notre étude produit plus efficacement de l'éthanol à partir du glucose que la souche utilisée dans leur étude.

En revanche, Lertwattanasakul *et al.* (2007) ont rapporté une production importante d'éthanol (88,1%) à partir du glucose par une autre souche de *K. marxianus* DMKU 3-1042 à 45°C en milieu YPD (Yeast-Peptone-Dextrose) contenant 20 g/L de glucose. De même, Vallet *et al.* (1996) ont trouvé un rendement éthanolique de 86,8% à partir du glucose par *K. marxianus* 30016 à 30°C. Cette production d'éthanol plus importante que dans notre étude (55,7%) est probablement due à la différence de souches, du milieu de culture ou de la température même si la concentration en glucose est identique (20 g/L).

Dans notre étude, *K. marxianus* montre une production d'éthanol à partir du glucose, galactose et mannose, de 5,7 g/L, 4,9 g/L et 4,9 g/L respectivement, moins importante que celle observée pour *S. cerevisiae* : 8,9 g/L, 7,0 g/L et 7,0 g/L à partir du glucose, galactose et mannose, respectivement. Ceci pourrait être expliqué par le fait que *K. marxianus*, contrairement à *S. cerevisiae*, est décrite comme Crabtree négative, suggérant que cette levure est capable de maintenir un flux constant de la glycolyse plutôt à travers la biosynthèse des glucides et la voie des pentoses phosphates (qui est plus active que chez *S. cerevisiae*) que via la voie de l'éthanol (Jacoby *et al.*, 1993).

#### 2.2.1.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose

L'effet de la répression catabolique qui peut s'exercer par le glucose sur les autres hexoses dans un mélange a également été étudié chez *K. marxianus* en aérobiose (**Figure III.8**). Ces résultats montrent une assimilation simultanée plus rapide pour le glucose puis le mannose par rapport au galactose. En effet, on enregistre à 7 h une concentration de 1,5, 3,6 et 7,0 g/L pour le glucose, le mannose et le galactose, respectivement.



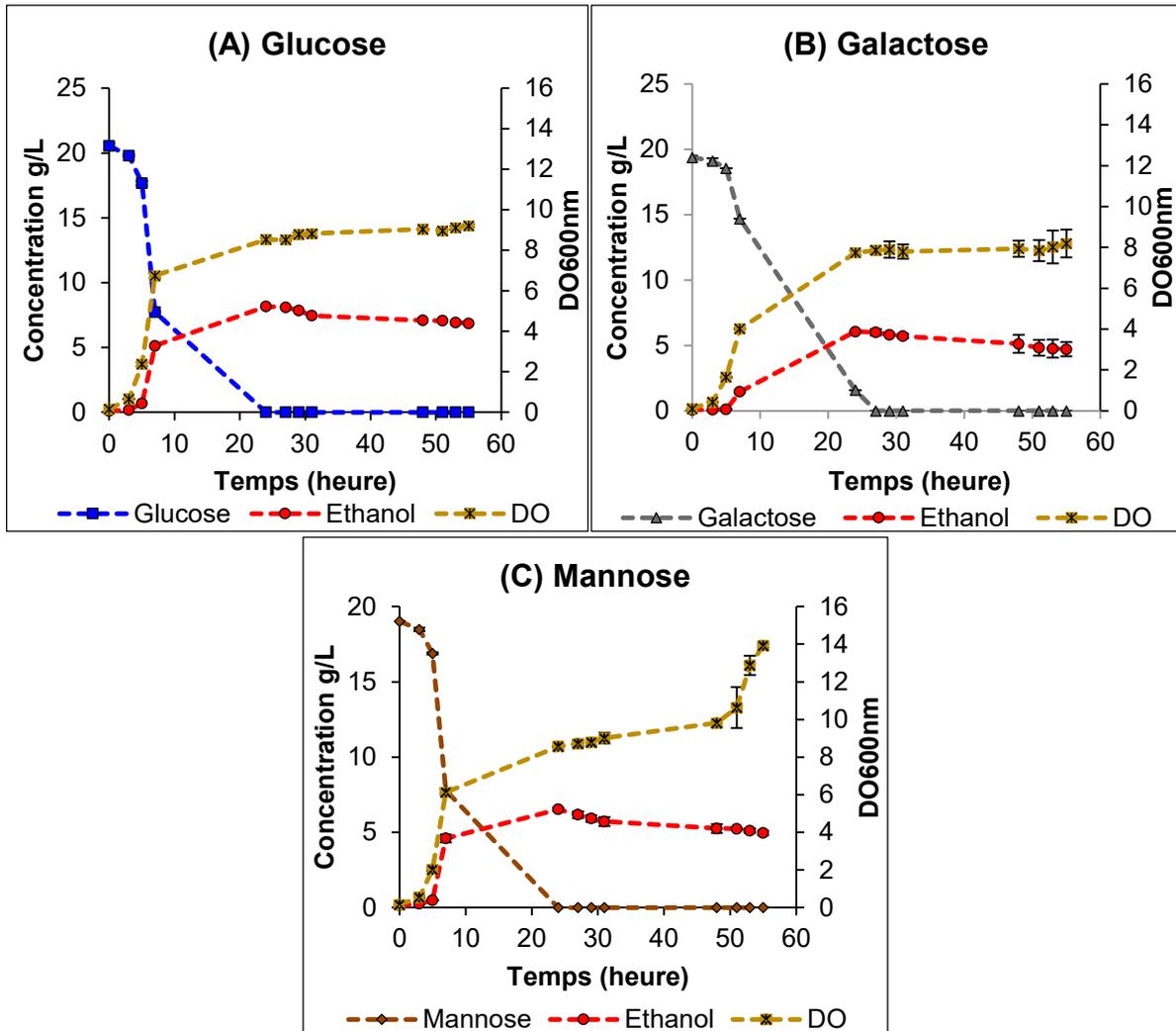
**Figure III.8.** Cinétique de croissance de *K. marxianus* et dosage de sucres et d'éthanol sur milieu YM + mélange d'hexoses à 35°C en aérobiose

Fonseca *et al.* (2013) ont signalé des observations similaires quant à l'assimilation préférentielle du glucose par *K. marxianus* sur mélange de glucose et de galactose. Ils ont constaté que le glucose exerce une forte régulation sur le galactose vu que ce dernier ne commence à être consommé que lorsque le glucose atteint une concentration de 2 g/L. Ceci rejoint ce qui a été cité précédemment que le galactose entre en compétition avec le glucose pour le même transporteur qui a plus d'affinité pour le glucose que pour le galactose. Au bout de 24 h, la concentration des trois sucres dans le milieu devient nulle quand la production d'éthanol atteint 5,3 g/L. Ce maximum d'éthanol formé était plus important que celui obtenu sur mannose ou galactose séparés mais légèrement inférieur à celui obtenu sur glucose. Après consommation des hexoses présents dans le milieu, la levure consomme l'éthanol produit dont la concentration diminue progressivement au-delà de 24 h.

## 2.2.2. Conditions anaérobies

### 2.2.2.1. Sur glucose, galactose ou mannose

Les conditions anaérobies ont conduit à une diminution de la croissance de la levure *K. marxianus* qui se traduit par une diminution significative des valeurs de DO<sub>600nm</sub> mesurées (**Figure III.9**).



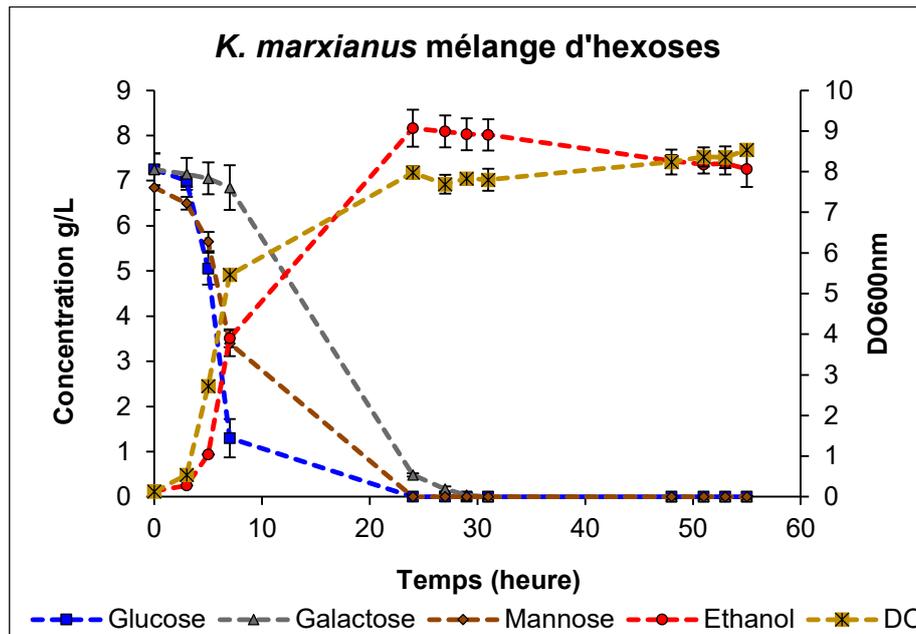
**Figure III.9.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *K. marxianus* en YM glucose (A), YM galactose (B) et YM mannose (C) à 35°C en conditions anaérobies

La DO<sub>600nm</sub> maximale enregistrée sur le mannose (DO<sub>600nm</sub> = 13,9) était plus élevée que celle sur le glucose (DO<sub>600nm</sub> = 9,2) ou sur le galactose (DO<sub>600nm</sub> = 8,2). En revanche, la production maximale d'éthanol était plus importante sur le glucose : 8,2 g/L que sur le mannose : 6,5 g/L ou le galactose : 6,1 g/L (**Figure III.9**). Ces maximums sont atteints à 24 h quand tout le sucre est catabolisé. Similairement à *S. cerevisiae*, sous conditions anaérobies, bien que la croissance sur hexoses soit plus faible, les rendements éthanoliques ont été améliorés de +43,2% sur glucose et de +34,1 sur galactose et mannose. De plus, il est à noter que la concentration en éthanol reste stable après épuisement des hexoses, soulignant une faible consommation de l'éthanol par la levure contrairement aux cultures réalisées en aérobiose. Il semble que la levure *K. marxianus* produit plus d'éthanol en conditions anaérobies, similairement

à *S. cerevisiae*. Ces résultats mettent en évidence que l'anaérobiose favorise le métabolisme fermentaire chez les levures (Fiechter *et al.*, 1981).

### 2.2.2.2. Sur mélange de glucose, galactose et mannose

Les cultures de *K. marxianus* sur le milieu YM avec mélange d'hexoses sous conditions anaérobies montrent des résultats similaires (**Figure III.10**) à celles en aérobie.



**Figure III.10.** Cinétique de croissance de *K. marxianus* et dosage de sucres et d'éthanol sur milieu YM + mélange d'hexoses à 35°C en conditions anaérobies

Une consommation plus rapide est notée pour le glucose et le mannose par rapport au galactose. Au bout de 24 h, la concentration des trois sucres dans le milieu devient nulle quand la production d'éthanol atteint son maximum qui est plus importante (8,2 g/L) qu'en aérobie (5,3 g/L). Comme pour *S. cerevisiae*, la levure *K. marxianus* montre dans ces conditions une faible consommation de l'éthanol produit après épuisement des sucres.

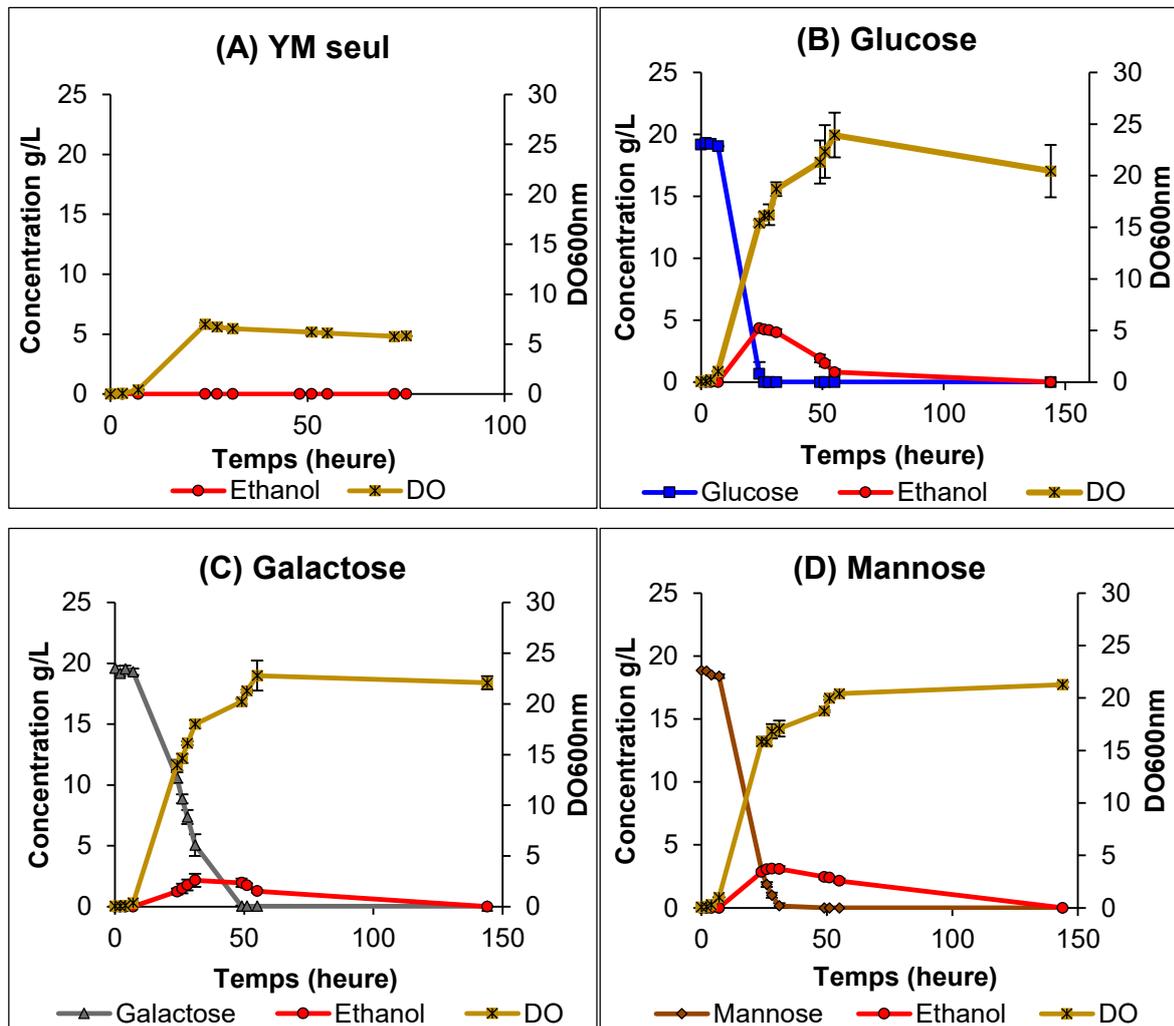
## 2.3. *Scheffersomyces shehatae*

Dans la littérature, les études rapportées utilisant la levure *S. shehatae* abordent le plus souvent son utilisation pour la fermentation des hydrolysats de substrats lignocellulosiques riches en xylane notamment la bagasse de canne à sucre (Antunes

et al., 2014 ; Senatham et al., 2016 ; Antunes et al., 2018) puisqu'elle est capable de fermenter à la fois les hexoses et le xylose.

### 2.3.1. Conditions aérobies

Les mesures photométriques ont révélé que la levure *S. shehatae* CLIB 1339 se développe aussi bien sur le galactose et le mannose que sur le glucose où les DO<sub>600nm</sub> atteintes au temps t=55 h sont respectivement, 23,9 en YM glucose, 22,8 en YM galactose et 20,4 en YM mannose (**Figure III.11**).



**Figure III.11.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. shehatae* en YM seul (A), YM glucose (B), YM galactose (C) et YM mannose (D) à 30°C en aérobiose

La consommation de sucres et la production d'éthanol permettent de constater que les trois hexoses ont été assimilés par la levure mais avec des vitesses différentes, notamment plus lente dans le cas du galactose. En effet, on note que le glucose est

totalemment métabolisé à 26 h, alors que le mannose et le galactose sont épuisés à 31 et 48 h, respectivement (**Figure III.11**). Cette constatation a également été précisée par Jeffries and Sreenath (1988) qui a rapporté que le galactose était fermenté par *S. shehatae* ATCC 22984 mais avec un taux largement inférieur à celui du glucose ou du mannose.

Par ailleurs, une production d'éthanol est observée à partir de chacun des trois hexoses et est maximale au temps  $t=24$  h pour le glucose (4,4 g/L) et aux temps  $t=31$  h (2,2 g/L) et  $t=28$  h (3,1 g/L) pour le galactose et le mannose, respectivement (**Figure III.11**). Toutefois la fermentation éthanolique des hexoses par cette levure paraît moins importante comparée aux deux levures modèles déjà discutées plus haut : *S. cerevisiae* et *K. marxianus*, confirmant la littérature (Du Preez *et al.*, 1986 ; Prior *et al.*, 1989 ; Laplace *et al.*, 1991).

La production d'éthanol par *S. shehatae* est plus importante à partir du glucose (43,1%) par rapport aux deux autres hexoses (21,5 et 30,3% à partir du galactose et du mannose, respectivement). Dans le cas du galactose, la concentration maximale en éthanol atteinte est la plus faible par rapport aux deux autres hexoses. Ces résultats confirment ceux déjà rapportés par Du Preez *et al.* (1986) qui ont observé une production d'éthanol par *S. shehatae* CSIR-Y492 sur chacun des trois hexoses avec un rendement éthanolique de 62,6% à partir du glucose ou du mannose, alors que sur galactose, il était de 58,7%, inférieur aux deux autres hexoses.

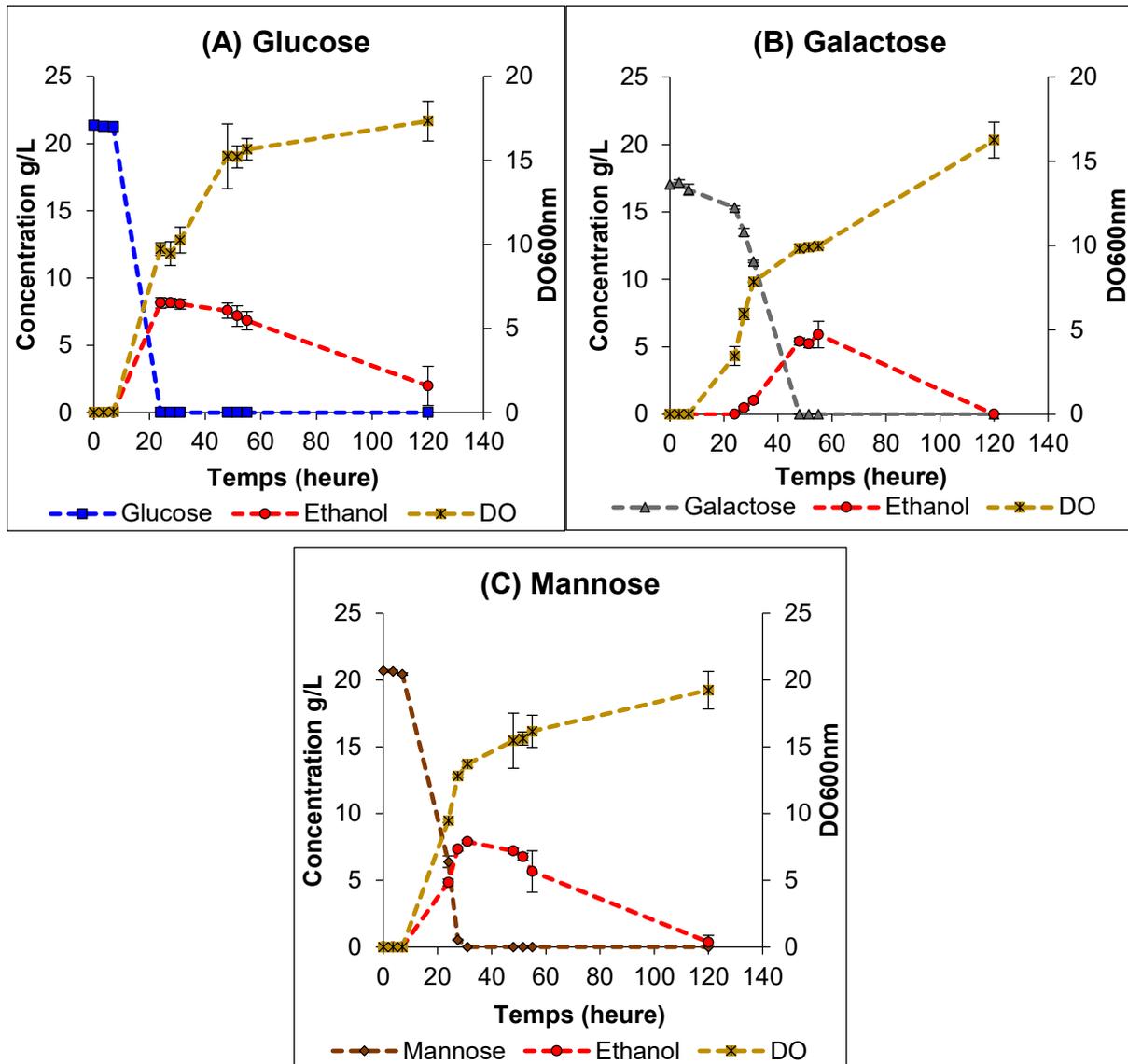
*S. shehatae* consomme totalement l'éthanol produit après avoir consommé le sucre présent dans le milieu, similairement à *S. cerevisiae* et *K. marxianus* décrites plus haut.

### 2.3.2. Conditions anaérobies

Pour la levure *S. shehatae*, les cultures sur les trois hexoses : glucose, galactose ou mannose ont été également menées en conditions anaérobies afin de tester l'effet de l'aération sur la croissance de cette levure ainsi que sur la formation de l'éthanol. Les graphes montrant l'évolution de la croissance et celle de la concentration des sucres et de l'éthanol sont illustrés en **Figure III.12**.

En conditions anaérobies, les trois hexoses sont entièrement consommés par la levure *S. shehatae*. Comme pour le galactose en aérobiose, l'assimilation de ce

dernier en conditions anaérobies se fait aussi plus lentement par rapport au glucose ou mannose. En effet, on note une consommation totale du glucose à 24 h, du mannose à 27 h, alors que celle du galactose n'a eu lieu qu'en 48 h (**Figure III.12**).



**Figure III.12.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. shehatae* en YM glucose **(A)**, YM galactose **(B)** et YM mannose **(C)** à 30°C en conditions anaérobies

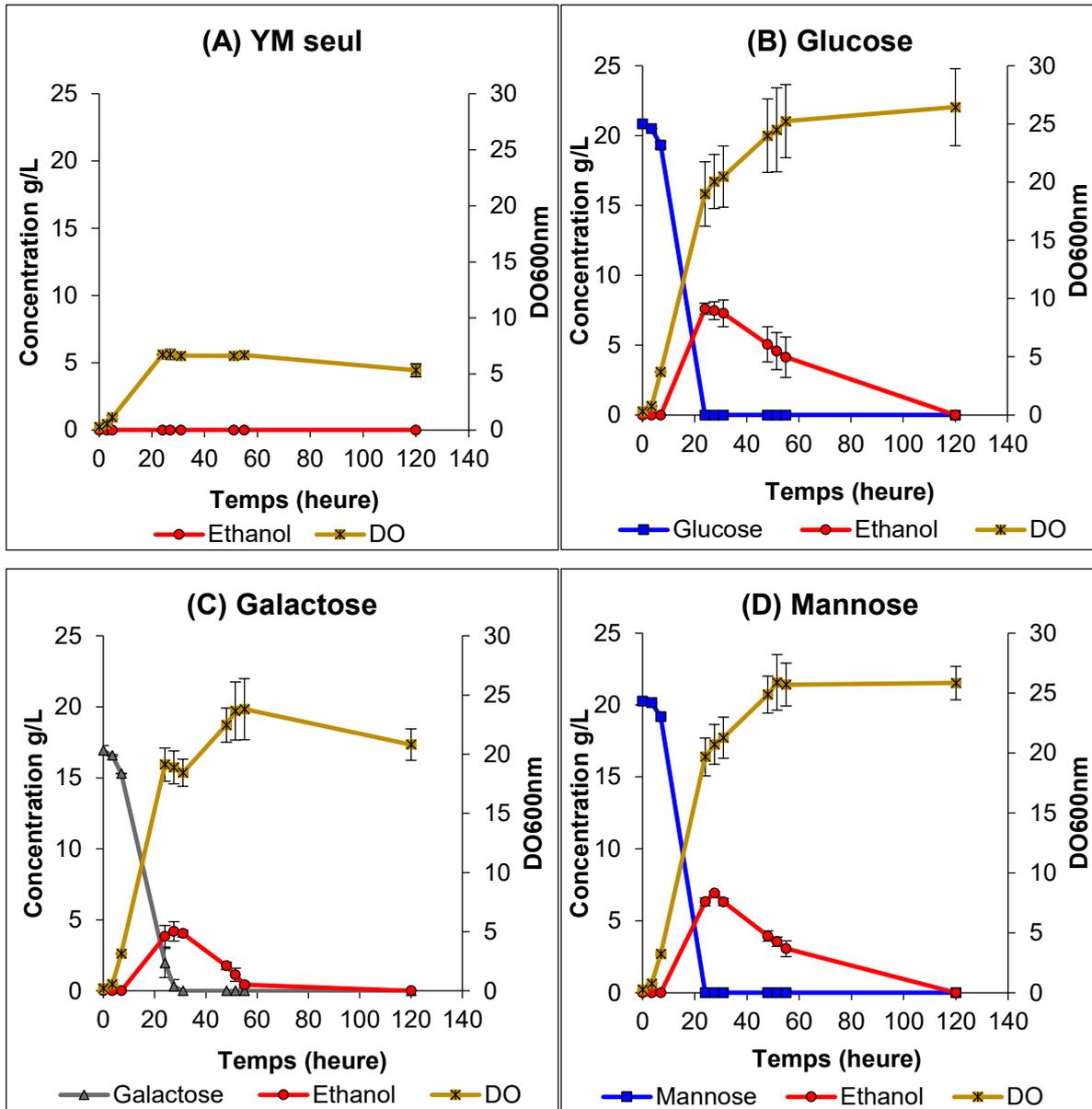
Ceci pourrait être dû au transport du galactose à l'intérieur de la cellule, apparemment moins efficace que les deux autres hexoses mais aussi au métabolisme différent du galactose par rapport aux deux autres hexoses. L'utilisation du galactose se fait selon la voie de Leloir où le galactose est converti en galactose-1-phosphate, puis en glucose-1-phosphate et glucose-6-phosphate qui entrera ensuite dans la glycolyse (Frey, 1996 ; Holden *et al.*, 2003 ; Sellick *et al.*, 2008).

L'assimilation de ces trois hexoses en conditions anaérobies sert à la fois pour la production de biomasse qui se traduit par une croissance légèrement moins importante qu'en aérobiose et pour la fermentation de ces sucres en éthanol. Les  $DO_{600nm}$  maximales enregistrées dans ces conditions pour *S. shehatae* étaient 17,0 sur le glucose, 16,3 sur le galactose et 19,2 sur le mannose. Il est à noter que malgré une légère diminution de la croissance de cette levure observée entre aérobiose et anaérobiose, sa croissance sur ces milieux reste importante même sous limitation en oxygène. Ceci n'était pas le cas des deux levures précédentes : *S. cerevisiae* et *K. marxianus* où une diminution drastique a été observée entre aérobiose et conditions anaérobies. En revanche, l'anaérobiose provoque une amélioration significative de la fermentation éthanolique d'un facteur de 1,9 pour le glucose, 2,7 et 2,5 pour le galactose et le mannose, respectivement. Cette amélioration qui est la plus importante dans le cas du galactose engendre les concentrations en éthanol suivantes : 8,2 g/L sur le glucose, 5,9 sur le galactose et 7,9 g/L sur le mannose. Ces concentrations maximales en éthanol coïncidant au même moment de la disparition totale des hexoses, commencent à diminuer progressivement après épuisement de ces derniers montrant une consommation de l'éthanol produit. La meilleure production de l'éthanol sous ces conditions anaérobies remarquée dans notre étude rejoint ce qui a été déjà précisé dans la littérature : en présence d'excès d'oxygène, le flux du pyruvate formé suite à la glycolyse est plutôt dévié de la voie de fermentation éthanolique vers le cycle de Krebs menant à une production cellulaire au détriment de l'éthanol (Laplace *et al.*, 1991).

## **2.4. *Scheffersomyces stipitis***

### 2.4.1. Conditions aérobies

Les résultats de mesure de  $DO_{600nm}$  ont montré une croissance importante de *S. stipitis* CLIB 187 sur les trois milieux : YM glucose, YM galactose et YM mannose. Les  $DO_{600nm}$  maximales atteintes au temps  $t=55$  h sont respectivement 25,2 en YM glucose, 23,8 en YM galactose et 25,7 en YM mannose (**Figure III.13**).



**Figure III.13.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. stipitis* en YM seul (A), YM glucose (B), YM galactose (C) et YM mannose (D) et à 30°C en aérobiose

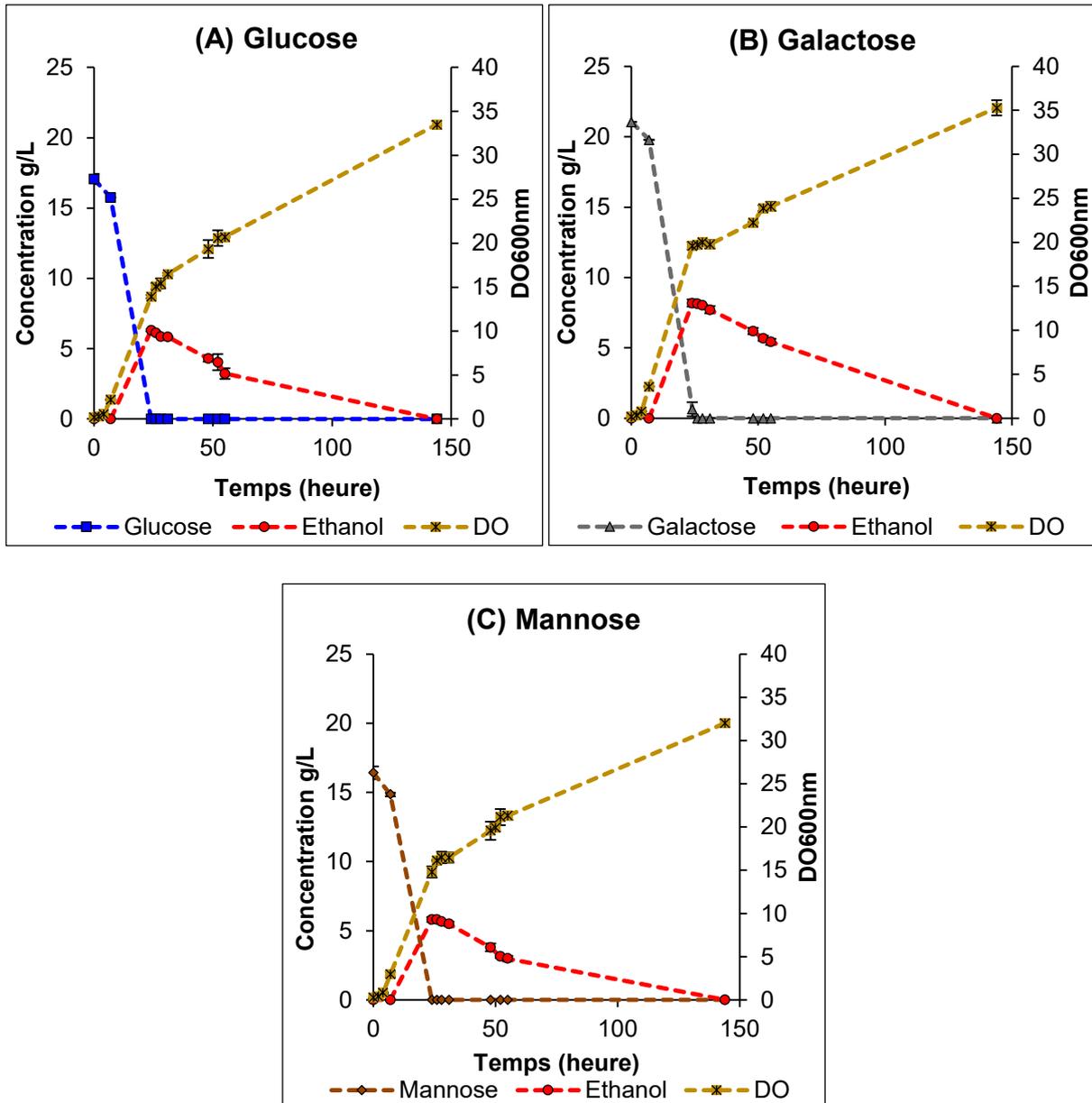
Sur le milieu YM glucose, la DO augmente légèrement au-delà de 55 h jusqu'à 26,4 à 120 h, alors qu'elle baisse jusqu'à 20,8 sur YM galactose et reste presque constante (25,8) sur le YM mannose.

Quant à la consommation des sucres, tandis que le glucose et le mannose sont totalement consommés en 24 h, le galactose est épuisé au temps  $t=31$  h (Figure III.13). Une consommation plus lente du galactose est également notée pour *S. stipitis* similairement aux autres levures testées.

Par ailleurs, la production maximale d'éthanol est observée au temps  $t=24$  h pour le glucose (7,6 g/L) et aux temps  $t=31$  h (4,2 g/L) et  $t=28$  h (7,0 g/L) pour le galactose et le mannose, respectivement. En termes de rendements éthanoliques, ces concentrations maximales en éthanol correspondent à 74,4, 40,9 et 67,8% sur le glucose, galactose et mannose, respectivement. Ainsi, la production d'éthanol par *S. stipitis* est plus importante à partir du glucose par rapport aux deux autres hexoses (**Figure III.13**). De même, un rendement similaire en éthanol autour de 74,0% par *S. stipitis* CBS 6054 à partir du glucose a été rapporté par (Agbogbo *et al.*, 2006). Il est remarquable que ces rendements en éthanol à partir des hexoses sont supérieurs à ceux obtenus par *S. shehatae*. Du Preez *et al.* (1986) ont retrouvés des résultats similaires quant à la meilleure production d'éthanol par *S. stipitis* à partir de ces trois hexoses par rapport à *S. shehatae*.

#### 2.4.2. Conditions anaérobies

Les résultats des mesures de  $DO_{600nm}$  et des analyses des concentrations des sucres et de l'éthanol obtenus lors des cultures de *S. stipitis* sur le glucose, le galactose ou le mannose en conditions anaérobies sont montrés dans la **Figure III.14**.



**Figure III.14.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. stipitis* en YM glucose (A), YM galactose (B) et YM mannose (C) à 30°C en conditions anaérobies

Sous conditions anaérobies, la levure *S. stipitis* consomme les trois hexoses qui sont épuisés à 24 h. En suivant l'évolution de la  $DO_{600nm}$ , on constate que la levure entre en phase exponentielle après 5 h, considéré comme phase de latence. Durant cette phase exponentielle de croissance, la levure consomme le sucre présent dans le milieu pour produire de la biomasse et de l'éthanol à la fois. La production maximale d'éthanol est enregistrée au moment où la concentration des sucres devient nulle. Au-delà de 24 h, après épuisement des sucres dans les milieux, la levure consomme l'éthanol produit et continue à se développer pour atteindre à 55 h les  $DO_{600nm}$

suivantes : 20,7, 24,1 et 21,3 sur glucose, galactose et mannose, respectivement. En continuant la cinétique jusqu'à 144 h, une augmentation de la DO<sub>600nm</sub> est notée dans les 3 cas ce qui est corrélée avec la consommation de l'éthanol.

L'anaérobiose contribue à l'amélioration de la production d'éthanol à partir du galactose uniquement, soit une augmentation de la concentration en éthanol d'un facteur 2. Inversement, ces conditions n'ont pas favorisé la production d'éthanol par *S. stipitis* à partir du glucose ou du mannose où une diminution de la concentration d'éthanol a été constatée. Les maximums d'éthanol mesurés à 24 h sont 6,3 g/L (61,7%) sur glucose, 5,8 g/L (56,8%) sur mannose et 8,2 g/L (80,0%) sur galactose. Cette amélioration de la production d'éthanol uniquement sur le galactose conduisant à une concentration maximale en éthanol plus élevée que celle obtenue sur glucose en aérobiose est observée pour la première fois avec cette souche de levures différemment des 3 souches de levures décrites précédemment.

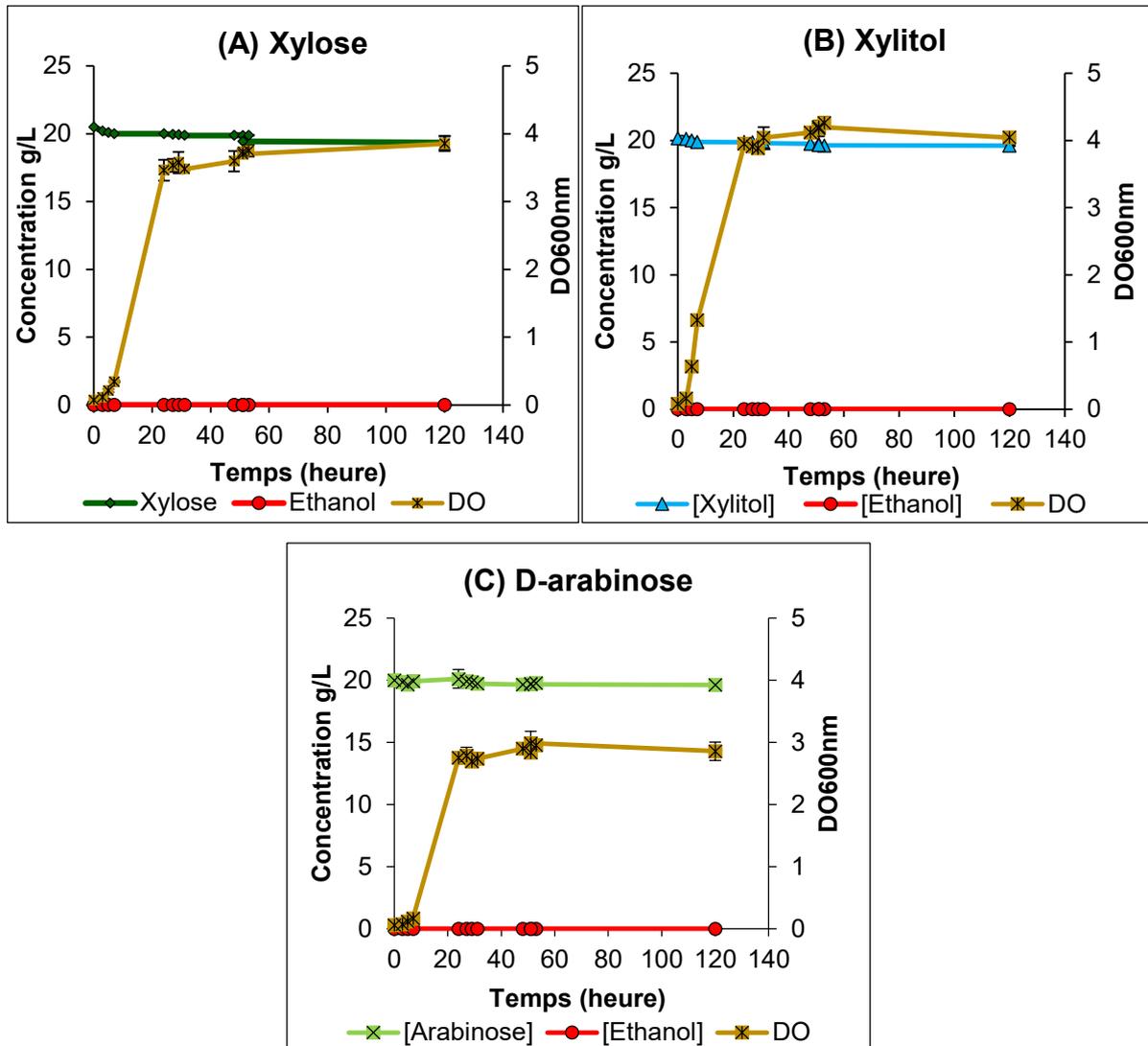
### **3. Cultures des levures sur pentoses et xylitol**

Les principaux sucres fermentescibles libérés suite à l'hydrolyse de polysaccharides de la biomasse lignocellulosique sont respectivement le glucose, le xylose, le mannose, le galactose et l'arabinose (Taherzadeh *et al.*, 1997 ; Jeffries and Sreenath, 1988). Vu l'importante quantité de D-xylose présente dans l'hémicellulose de certaines BLC et son potentiel en tant que substrat pour la production d'éthanol à partir de la biomasse, de nombreuses études ont été effectuées sur la fermentation de ce sucre par les levures (Jeffries, 1983 ; Kurtzman, 1983 ; Schneider *et al.*, 1983 ; Rouhollah *et al.*, 2007 ; Antunes *et al.*, 2014).

#### **3.1. *Saccharomyces cerevisiae***

La levure modèle de fermentation des hexoses *S. cerevisiae* est décrite comme étant incapable de fermenter les pentoses issus de l'hémicellulose (par manque d'enzymes impliquées dans l'assimilation des pentoses) (Bai *et al.*, 2008 ; Gírio *et al.*, 2010 ; Ha *et al.*, 2011), mais peut fermenter le xylulose via la voie des pentoses phosphates (Dellomonaco *et al.*, 2010 ; Balat, 2011; Ha *et al.*, 2011). C'est pourquoi en plus des pentoses xylose et arabinose, le xylitol, un intermédiaire du catabolisme du xylose, a été également testé.

Les résultats obtenus avec *S. cerevisiae* sur les milieux YM xylose, YM xylitol et YM arabinose (**Figure III.15**) ont montré une faible croissance avec une DO<sub>600nm</sub> maximale de 3,8, 4,2 et 3,0, respectivement.



**Figure III.15.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *S. cerevisiae* en YM xylose (A), YM xylitol (B) et YM D-arabinose (C) à 30°C en aérobiose

La croissance de *S. cerevisiae* sur YM xylose, YM xylitol ou YM arabinose est proche ou légèrement inférieure (YM D-arabinose) à celle obtenue sur le milieu YM seul sans ajout de sucre (**Figure III.1**). Un récapitulatif des résultats obtenus par *S. cerevisiae* sur pentoses est présenté dans le **Tableau III.1**.

**Tableau III.1.** Croissances et rendements maximaux en éthanol obtenus avec *S. cerevisiae* sur YM seul ou additionné de 20 g/L de substrat à 30°C en aérobiose

Milieu de culture	DO <sub>max</sub> <sub>600nm</sub>	[EtOH] max (g/L)	[Substrat] <sub>t=120h</sub> (g/L)
YM	4,0 (± 0,3)	0,0	-
YM xylose aérobie	3,8 (± 0,1)	0,0	19,4 (± 0,5)
YM xylitol aérobie	4,2 (± 0,2)	0,0	19,6 (± 0,0)
YM arabinose aérobie	3,0 (± 0,2)	0,0	19,6 (± 0,3)

Les trois glucides ne sont pas consommés par la levure et il n'y a aucune production d'éthanol (**Tableau III.1**), signalant que ces trois sucres ne sont pas assimilables par *S. cerevisiae* ni pour la biosynthèse de l'éthanol, ni pour la croissance cellulaire. Ainsi, ces résultats montrent que *S. cerevisiae* Sigma YSC2 Type II n'est pas capable de fermenter les sucres à 5 atomes de carbone confirmant la littérature. Ceci est expliqué par le fait que cette levure est dépourvue des deux enzymes impliquées dans le métabolisme du xylose à savoir la xylose réductase et la xylitol déshydrogénase. En effet, Yoon *et al.* (2003), Rouhollah *et al.* (2007) et plusieurs autres études ont rapporté qu'il n'y a aucune production d'éthanol à partir du xylose par la levure *S. cerevisiae*. De plus, la concentration constante des sucres dans le milieu, notamment le xylose, montrent que ce dernier n'a pas été transporté à l'intérieur des cellules ce qui affirme le fait que les transporteurs protéiques non spécifiques des hexoses chez *S. cerevisiae* présentent une affinité largement plus faible (100 fois) pour le D-xylose en comparaison avec le glucose (Lee *et al.*, 2002 ; Katahira *et al.*, 2006).

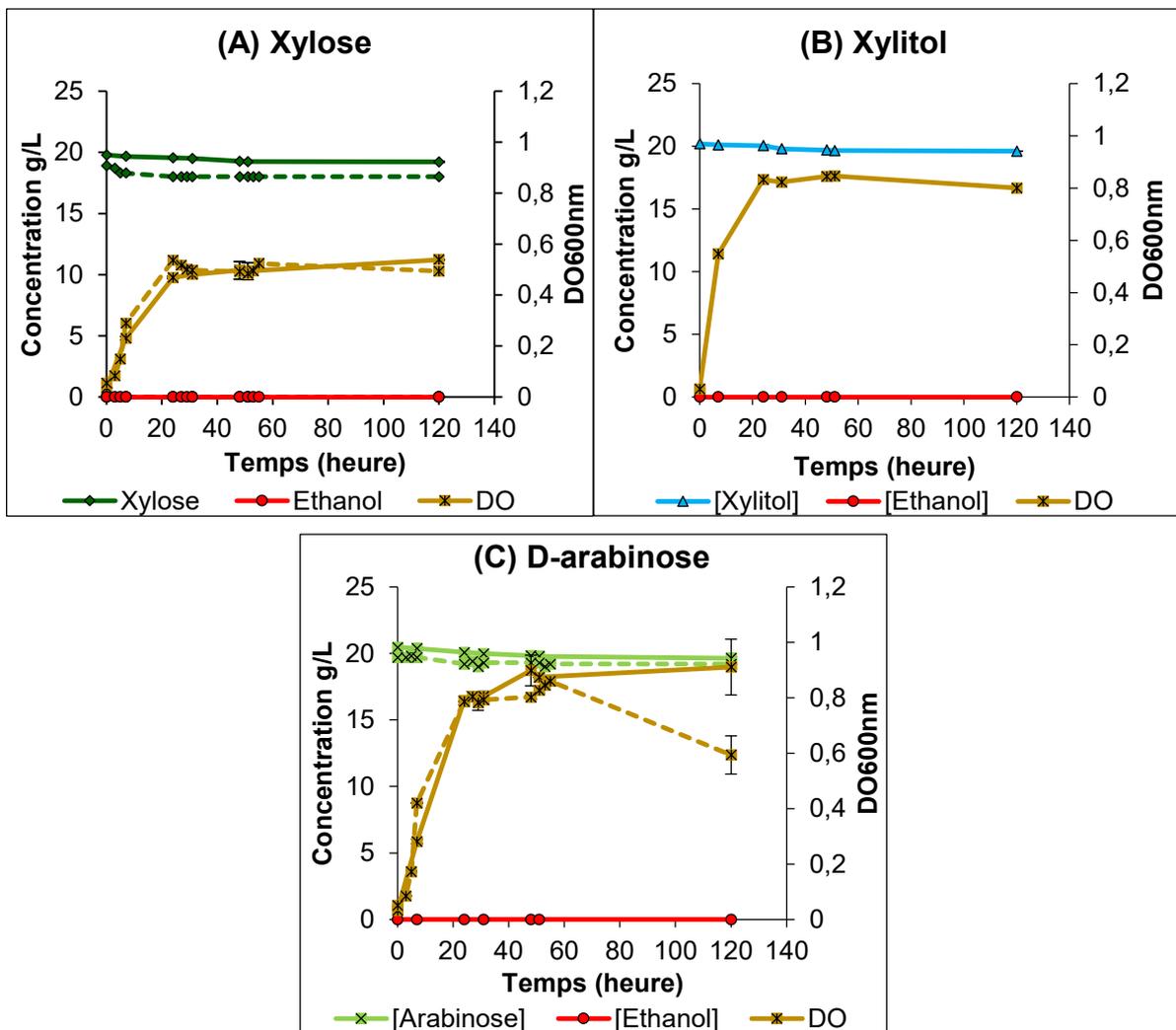
### 3.2. *Kluyveromyces marxianus*

La levure modèle thermotolérante *K. marxianus* est décrite comme étant capable de fermenter les hexoses. Cependant, les études concernant sa capacité d'assimiler et de fermenter les pentoses notamment le xylose sont très contradictoires. Certains auteurs ont décrit une consommation totale du D-xylose (à 20 g/L) et une production d'éthanol de 55% par *K. marxianus* SUB-80-S sous conditions aérobies (Margaritis and Bajpai, 1982), alors que d'autres ont rapporté une fermentation de ce pentose sous conditions anaérobies avec un rendement de 25% (Delgenes *et al.*, 1986). En revanche, il existe d'autres études qui précisent que *K. marxianus* ne fermentent pas le xylose quelle que soit la condition (Stambuk *et al.*, 2003 ; Ballesteros *et al.*, 2004).

Toutes ces études ne se référant pas exactement à la même souche, la fermentation du xylose par la levure *K. marxianus* peut être considérée comme souche-dépendante (Rouhollah *et al.*, 2007).

Pour ces raisons, la capacité de la souche de *K. marxianus* UMIP 2234.94 utilisée dans cette étude à fermenter les pentoses et le xylitol a été testée en conditions aérobies ainsi qu'en conditions anaérobies.

Les résultats des cultures de *K. marxianus* sur YM xylose en aérobiose et en anaérobiose, YM xylitol en aérobiose et YM D-arabinose en aérobiose et en anaérobiose sont illustrés dans la **Figure III.16 A, B et C**, respectivement.



**Figure III.16.** Cinétiques de croissance et dosage de sucres et d'éthanol lors de la croissance de *K. marxianus* en YM xylose (A) YM xylitol (B) et YM D-arabinose (C) à 35°C en aérobiose (lignes pleines) et en conditions anaérobies (lignes pointillées) sur YM xylose et YM arabinose

Comme pour *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, s'est également révélée incapable de cataboliser les pentoses et le xylitol (pentitol) que ce soit pour la fermentation éthanolique ou pour la multiplication cellulaire, en aérobiose et en anaérobiose. En effet, les valeurs de DO<sub>600nm</sub> mesurées sont effectivement faibles (**Tableau III.2**). En outre, aucune production d'éthanol ni consommation des pentoses n'ont été détectées dans le milieu de culture.

**Tableau III.2.** Croissances et rendements maximaux en éthanol obtenus avec *K. marxianus* sur YM seul ou additionné de 20 g/L de substrat à 35°C en aérobiose ou en anaérobiose

Milieu de culture	DO <sub>max600nm</sub>	[EtOH] max (g/L)	[Substrat] <sub>t=120h</sub> (g/L)
YM	1,9 (± 0,0)	0,0	-
YM xylose aérobie	0,5 (± 0,0)	0,0	19,4 (± 0,5)
YM xylitol aérobie	0,8 (± 0,1)	0,0	19,6 (± 0,0)
YM arabinose aérobie	0,9 (± 0,1)	0,0	19,6 (± 0,3)
YM xylose anaérobie	0,5 (± 0,0)	0,0	18,0 (± 0,0)
YM arabinose anaérobie	0,9 (± 0,0)	0,0	19,2 (± 0,0)

Comme montré dans le **Tableau III.2**, les DO maximales observées sur YM pentose ou pentitol sont inférieures comparées à celle sur YM seul sans sucre comme si l'ajout du xylose, du xylitol ou d'arabinose montre un effet négatif sur la croissance de *K. marxianus*. Une hypothèse serait que la présence du xylose, du xylitol ou de l'arabinose pourrait limiter la consommation des composés du milieu YM qui servent pour la croissance de la levure.

Margaritis and Bajpai (1982) ont rapporté que la souche de *K. marxianus* SUB-80-S produisait 5,6 g/L de l'éthanol à partir de 20 g/L du xylose en aérobiose, ce qui correspond à un rendement de 55%. De même, une autre souche de *K. marxianus* isolée de la bagasse de canne à sucre s'est montrée capable de fermenter le xylose avec un rendement proche de 50% (Rouhollah *et al.*, 2007). D'autre part, Delgenes *et al.* (1986) ont rapporté que l'aération du milieu de culture affecte l'efficacité de la conversion du xylose et que la souche *K. marxianus* NRRL Y2415 se développait et produisait de l'éthanol sur du xylose uniquement en conditions anaérobies (conditions micro-aérophiles). Toutefois, cette production d'éthanol par *K. marxianus* était moins efficace que celles obtenues avec les deux autres levures testées *Pichia stipitis* et

*Pachysolen tannophilus*. *K. marxianus* NRRL Y2415 consommait partiellement le xylose en conditions aérobies sans aucune production d'éthanol alors que les conditions anaérobies n'ont permis ni la croissance de cette levure ni la production d'éthanol. En outre, Signori *et al.* (2014) ont indiqué une corrélation entre la quantité d'oxygène présente dans le milieu et la consommation du xylose par *K. marxianus* CBS71. Plus la quantité d'oxygène est faible, plus la consommation du xylose est réduite. Bien que les deux enzymes essentielles du métabolisme du xylose : xylose réductase (XR) et xylitol déshydrogénase (XDH) soient présentes chez *K. marxianus* CBS71, aucune production d'éthanol à partir du xylose n'a été décelée. Signori et ses collaborateurs (2014) suggèrent que l'absence de la production d'éthanol est due à un dysfonctionnement des voies oxydo-réductives causé par le déséquilibre entre cofacteurs de XR et XDH, mais aussi à des mécanismes de régulation des enzymes post-transcriptionnels et/ou post-translationnels. Dans ces études citées plus haut, des souches de *K. marxianus* différentes de celle étudiée dans notre étude ont été utilisées ce qui expliquerait la différence de métabolisme observée.

### **3.3. *Scheffersomyces shehatae***

Les levures *Scheffersomyces shehatae* et *Scheffersomyces stipitis* sont reconnues parmi les meilleures souches fermentant à la fois le xylose et les hexoses mais avec des rendements éthanoliques (que ce soit sur glucose ou xylose) inférieurs d'environ 20% à ceux générés par la levure modèle *S. cerevisiae* sur glucose (Ligthelm *et al.*, 1988 ; Prior *et al.*, 1989 ; Gírio *et al.*, 2010).

Bien que le xylane soit le polymère dominant de nombreuses hémicelluloses, la teneur en L-arabinose est significative dans certaines sources lignocellulosiques, en particulier, les fibres de maïs et le son de blé en constituent deux exemples importants. D'autres exemples incluent les résidus de betteraves sucrières et de cannes à sucre, les écorces de riz et les cultures herbacées (Dien *et al.*, 1996 ; Gírio *et al.*, 2010).

L'arabinose existe naturellement dans la BLC sous forme de L-arabinose (McMillan and Boynton, 1994 ; Scheller and Ulvskov, 2010), nous nous proposons alors de tester la capacité de *S. shehatae* et *S. stipitis* à fermenter le L-arabinose en plus du D-arabinose qui a été testé sur *S. cerevisiae* et *K. marxianus*.

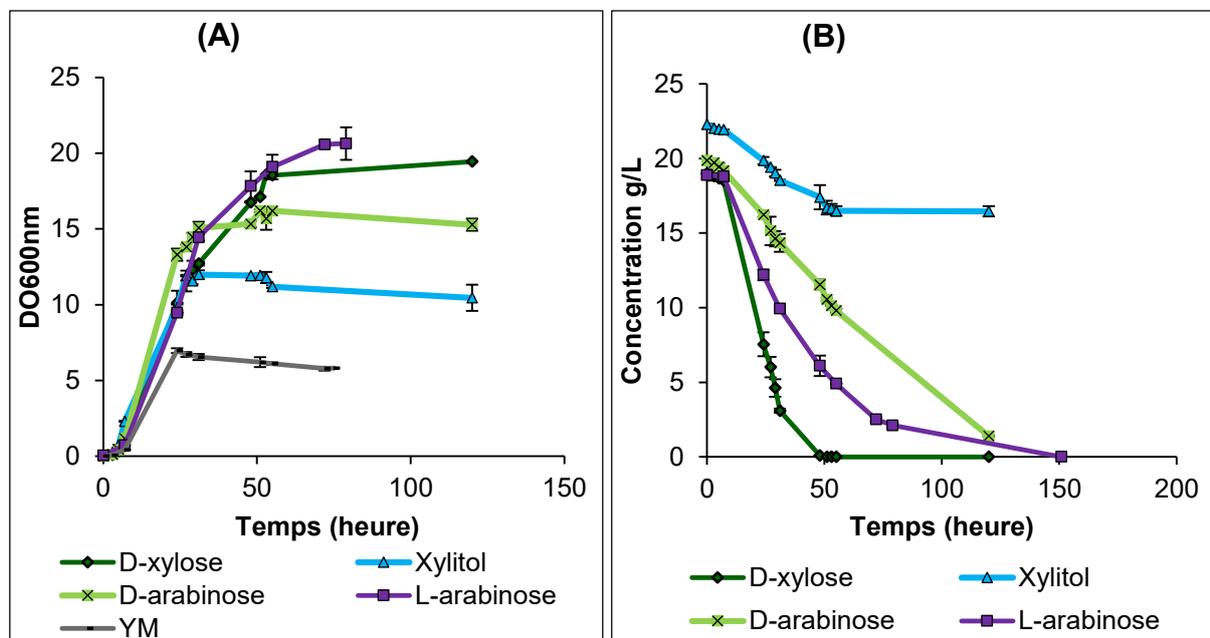
L'oxygène exerce un effet important sur la conversion du xylose en éthanol par les levures pour lequel il y a un niveau critique où le rendement et la productivité de

l'éthanol sont élevés et la croissance cellulaire est faible (Ligthelm *et al.*, 1988 ; Rizzi *et al.*, 1989 ; Skoog and Hahn-Hägerdal, 1990). Dans ce contexte, les cultures des deux levures modèles de fermentation du xylose, *S. shehatae* et *S. stipitis* ont été réalisées en aérobiose et en conditions anaérobies sur xylose mais également sur xylitol et arabinose.

### 3.3.1. Conditions aérobies

#### 3.3.1.1. Sur xylose, D-arabinose, L-arabinose ou xylitol

La présence du sucre dans le milieu de culture fait augmenter la croissance de *S. shehatae* par rapport au contrôle en milieu YM sans sucre ( $DO_{\max 600nm} = 6,9$ ) (Figure III.17 A).



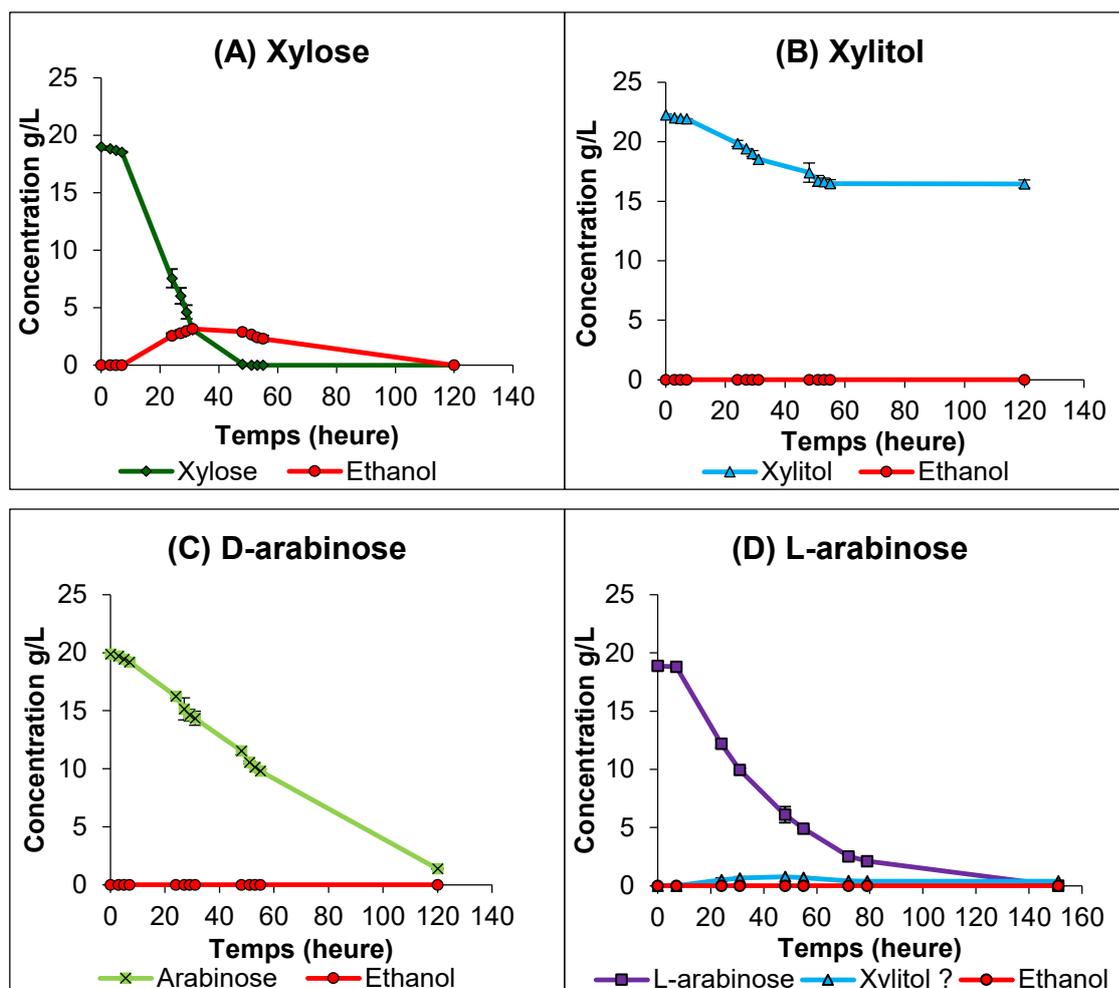
**Figure III.17.** Cinétiques de croissance (A) et dosage des sucres (B) lors de la croissance de *S. shehatae* en YM pentoses ou YM xylitol en aérobiose à 30°C

La croissance de *S. shehatae* est la plus importante sur YM L-arabinose ( $DO_{\max 600nm} = 20,5$ ) et sur YM xylose ( $DO_{\max 600nm} = 19,5$ ). Cependant on note une différence entre les deux formes énantiomères de l'arabinose où la croissance de *S. shehatae* est moins importante sur le D-arabinose ( $DO_{\max 600nm} = 16,2$ ). Ce qui peut être dû au fait que l'arabinose est naturellement présent dans les BLC sous forme du L-arabinose auquel les levures sembleraient plus adaptées. En outre, la plus faible croissance a été observée sur le YM xylitol ( $DO_{\max 600nm} = 12,0$ ) tout en étant

supérieure à celle sur milieu YM seul (**Figure III.17 A**). Toutefois, la croissance de *S. shehatae* reste inférieure sur YM pentoses par rapport aux hexoses.

Les résultats du dosage des pentoses ou du xylitol obtenus par HPLC reflétant la consommation des sucres par la levure sont représentés en **Figure III.17 B**. Les profils de la consommation des sucres par *S. shehatae* sont différents en termes de consommation et de vitesses auxquelles ces sucres sont consommés. En effet, le xylose étant entièrement consommé par *S. shehatae* en 48 h est le plus rapidement assimilé. Le L-arabinose est aussi totalement consommé mais plus lentement que le xylose vu que sa concentration résiduelle à 48 h est de 6,1 g/L alors que celle du xylose est nulle. Cependant, la consommation du D-arabinose est plus lente que celle de son énantiomère (L-arabinose) avec une concentration résiduelle [arabinose]<sub>120h</sub>=1,4 g/L. Ces résultats expliquent donc la différence de la croissance de *S. shehatae* sur ces deux formes d'arabinose (DO maximale de 16,2 et 20,6 sur YM D-arabinose et YM L-arabinose, respectivement). Cela met en évidence que le L-arabinose représente une source carbonée préférée pour *S. shehatae*, vu qu'il existe sous cette forme dans les BLC. Le xylitol est partiellement consommé par la levure où une légère diminution de sa concentration a été observée [xylitol]<sub>120h</sub>=16,5 g/L (**Figure III.17 B**).

La production d'éthanol a été uniquement décelée sur xylose (**Figure III.18 A**) où un maximum de 3,2 g/L a été mesuré à 31 h. Bien que *S. shehatae* consomme partiellement le xylitol (**Figure III.18 B**), presque totalement le D-arabinose (**Figure III.18 C**) et totalement le L-arabinose (**Figure III.18 D**) aucune production d'éthanol n'a été enregistrée sur ces milieux. Cependant, sur le L-arabinose, l'apparition d'un produit sortant au même temps de rétention que le xylitol ou le L-arabitol est remarquée mais en quantité très faible (0,8 g/L) (**Figure III.18 D**).



**Figure III.18.** Cinétiques de consommation des sucres et production d'éthanol par *S. shehatae* sur YM xylose (A), YM xylitol (B), YM D-arabinose (C) et YM L-arabinose (D) à 30°C en aérobiose

Après l'épuisement du xylose à 48 h, la diminution de la concentration de l'éthanol dans le milieu montre que *S. shehatae* utilise efficacement l'éthanol comme source de carbone, en accord avec les travaux de Abbi *et al.* (1996). Ces résultats montrent de faibles rendements en éthanol à partir du xylose (31,3%), puisqu'une diminution de rendement éthanolique maximal est remarquée d'un facteur de 1,4 par rapport à celui obtenu sur glucose (43,1%), conformément à la littérature (Ligthelm *et al.*, 1988 ; Prior *et al.*, 1989 ; Gírio *et al.*, 2010).

Jeffries and Sreenath (1988) ont trouvé un rendement éthanolique de 43,1% sur xylose en conditions aérobies par *S. shehatae* ATCC 22984 alors que Abbi *et al.* (1996) ont rapporté un rendement éthanolique supérieur sur xylose (82,2%) en utilisant des cellules immobilisées de *S. shehatae* NCL-3501. Par ailleurs, Du Preez *et al.* (1986) ont constaté que la concentration initiale en xylose affecte la production

maximale d'éthanol par *S. shehatae*. Ces auteurs ont étudié la fermentation du xylose à des concentrations initiales comprises entre 10 et 100 g/L et ont trouvé que la meilleure production d'éthanol a été observée avec 50 g/L du xylose (rendement éthanolique de 72,4%).

En outre, le xylitol et l'arabinose ne sont pas fermentés en éthanol et la diminution de leur concentration dans le milieu pourrait être attribuée à leur utilisation par *S. shehatae* pour la croissance (Du Preez *et al.*, 1986). Ces observations confirment l'absence de production d'éthanol à partir d'arabinose par la levure *S. shehatae* déjà rapportée dans la littérature (Magee and Kosaric, 1985 ; Witteveen *et al.*, 1989 ; Dien *et al.*, 1996 ; Fonseca *et al.*, 2007 ; Gírio *et al.*, 2010). La souche de *S. shehatae* CLIB 1339 utilisée dans cette étude présente l'avantage de consommer le L-arabinose au moins pour se développer contrairement à une autre souche de *S. shehatae* ATCC 22984 rapportée par Jeffries and Sreenath (1988).

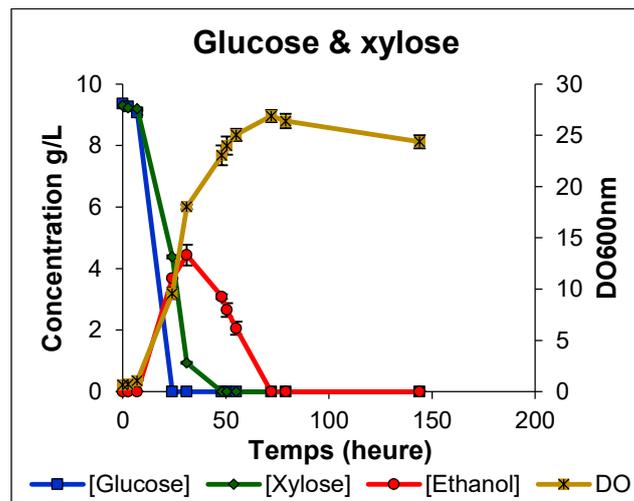
Par ailleurs, Dien *et al.* (1996) ont testé la capacité de 116 souches de levures (y compris les souches de *S. shehatae* NRRL Y-12856, Y-12858 et Y-17029 et *S. stipitis* NRRL Y-11545 et Y-7124) à fermenter le L-arabinose et ont révélé que seulement quatre espèces de levures sont capables de produire de faibles rendements en éthanol (inférieur ou égal à 7%) sur le L-arabinose (initialement présent à 100 g/L). Ces quatre levures sont les suivantes : *Candida aurangiensis* NRRL Y-11848, *Candida succiphila* NRRL Y-11997 et Y-11998, *Ambrosiozyma monospora* NRRL Y-1081, Y-5955 et Y-1484 et *Candida sp.* NRRL YB-2248, plus tard nommée *Candida arabinofermentans* (Kurtzman and Dien, 1998).

### 3.3.1.2. Sur mélange de glucose et xylose

Bien que plusieurs microorganismes soient capables d'assimiler les pentoses, le catabolisme de ces pentoses est typiquement réprimé par le glucose : les sucres non préférés tels que les pentoses sont accumulés dans le milieu jusqu'à ce que le sucre préféré (*i.e.*, glucose) soit complètement consommé (Kim *et al.*, 2010).

Nous avons déjà testé l'effet répresseur du glucose sur d'autres hexoses dans un mélange sur les deux levures modèles *S. cerevisiae* et *K. marxianus*, nous cherchons maintenant à tester l'effet du glucose sur la consommation du xylose en mélange par *S. shehatae* et *S. stipitis*.

Pour ce faire, les cultures de *S. shehatae* sont réalisées sur mélange de glucose et de xylose à des concentrations égales, soit une concentration de 10 g/L de chaque sucre. La croissance de la levure *S. shehatae* est plus importante sur mélange de glucose et de xylose ( $DO_{max\ 600nm} = 26,9$ ) que sur xylose ( $DO_{max\ 600nm} = 18,6$ ) ou glucose ( $DO_{max\ 600nm} = 23,9$ ) séparés. On note une consommation complète du glucose en 24 h alors que le xylose s'épuise en 31 h (**Figure III.19**). La quantité d'éthanol est maximale et égale à 4,4 g/L après épuisement des sucres, puis elle diminue et devient nulle du fait que l'éthanol est consommé en tant que source de carbone. La concentration maximale d'éthanol à partir du mélange de sucres est égale à celle obtenue en milieu YM glucose mais supérieure à celle en milieu YM xylose (**Tableau III.3**). Concernant la répression catabolique exercée par le glucose sur le xylose chez *S. shehatae*, on constate que le glucose est consommé préférentiellement vu qu'après 24 h, tout le glucose est consommé alors qu'il reste 4,4 g/L du xylose dans le milieu (**Figure III.19**).



**Figure III.19.** Cinétique de croissance, consommation du glucose et du xylose et production d'éthanol par *S. shehatae* en milieu YM avec mélange de glucose et de xylose à 30°C en aérobiose

**Tableau III.3.** Croissances et concentrations maximales en éthanol obtenues avec *S. shehatae* à 30°C en aérobiose

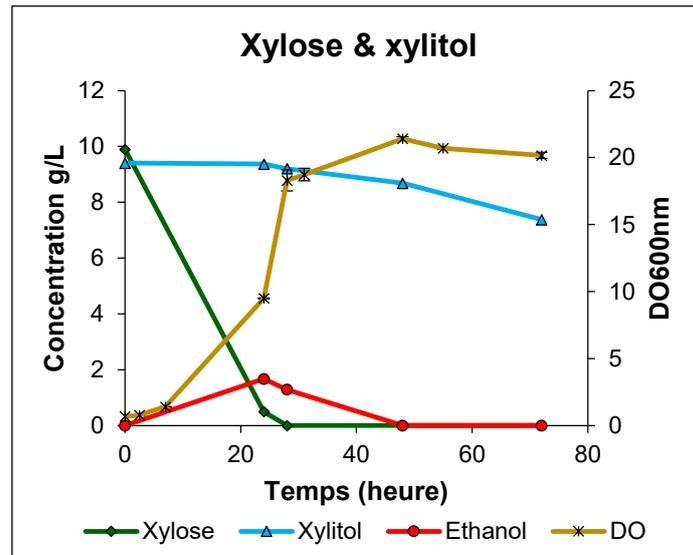
	<b>Glucose &amp; xylose (10 g/L chacun)</b>	<b>Glucose (20 g/L)</b>	<b>Xylose (20 g/L)</b>
DO <sub>600nm</sub> max	26,9 (± 0,6)	23,9 (± 2,3)	19,5 (± 0,7)
[Ethanol] max g/L	4,4 (± 0,3)	4,4 (± 0,1)	3,2 (± 0,1)

Ces observations confirment les résultats des études réalisées par Du Preez *et al.* (1986) et Jeffries and Sreenath (1988). Effectivement, Du Preez et ses co-auteurs (1986) ont noté un phénomène de diauxie dans l'assimilation de glucose et du xylose par *S. shehatae*. En employant 1% de glucose, xylose, cellobiose, galactose et mannose dans un mélange, ils ont observé que le glucose et le mannose ont été complètement consommés avant que le xylose ne soit consommé alors que le cellobiose n'était pas consommé du tout. Pourtant, Jeffries and Sreenath (1988) ont rapporté une consommation préférentielle du glucose par rapport au xylose sans pouvoir affirmer que le glucose et le xylose étaient consommés séquentiellement comme en diauxie, ceci faute de prélèvements suffisants. Il paraît donc nécessaire d'effectuer des mesures entre 10 h et 24 h afin de pouvoir tirer des conclusions sur la répression catabolique du glucose sur le xylose.

### 3.3.1.3. Sur mélange de xylose et xylitol

La levure *S. shehatae* CLIB 1339 utilisée dans notre étude est capable de fermenter le xylose en éthanol mais ne produit pas d'éthanol à partir du xylitol. Or, d'après la littérature, le xylose est catabolisé via la xylose réductase (XR) EC 1.1.1.21 (D-xylose → xylitol) et la xylitol déshydrogénase (XDH) EC 1.1.1.9 (xylitol → D-xylulose). Le xylulose est par la suite converti en éthanol après une série de réactions (décrites en détail dans le chapitre I : étude bibliographique). C'est pourquoi la raison pour laquelle le xylitol n'est pas fermenté par *S. shehatae* n'était pas claire. De plus, il a été rapporté que chez certaines levures telles que *Pachysolen tannophilus*, les enzymes essentielles permettant l'assimilation du xylose sont inductibles (Smiley and Bolen, 1982 ; Bolen and Detroy, 1985). Ceci permettrait de suggérer que l'assimilation du xylitol ou plutôt l'activation de la XDH est induite par l'activation de la xylose réductase (XR) et donc par la présence du xylose dans le milieu.

L'objectif de cette expérience est donc de tester cette hypothèse : l'activation de la XDH (donc la fermentation du xylitol en éthanol) est induite par l'activation de la XR (donc par la présence du xylose dans le milieu). Ce faisant, des cultures de *S. shehatae* ont été réalisées sur milieu YM contenant des proportions égales de xylose et de xylitol (10 g/L), ce qui correspond à une concentration finale de 20 g/L en sucre dans le milieu. Les résultats de l'évolution de la DO<sub>600nm</sub> et celle des concentrations des sucres et de l'éthanol sont représentés en **Figure III.20**.



**Figure III.20.** Cinétique de croissance et dosage du xylose, xylitol et de l'éthanol lors des cultures de *S. shehatae* sur YM avec mélange de xylose et de xylitol à 30°C en aérobiose

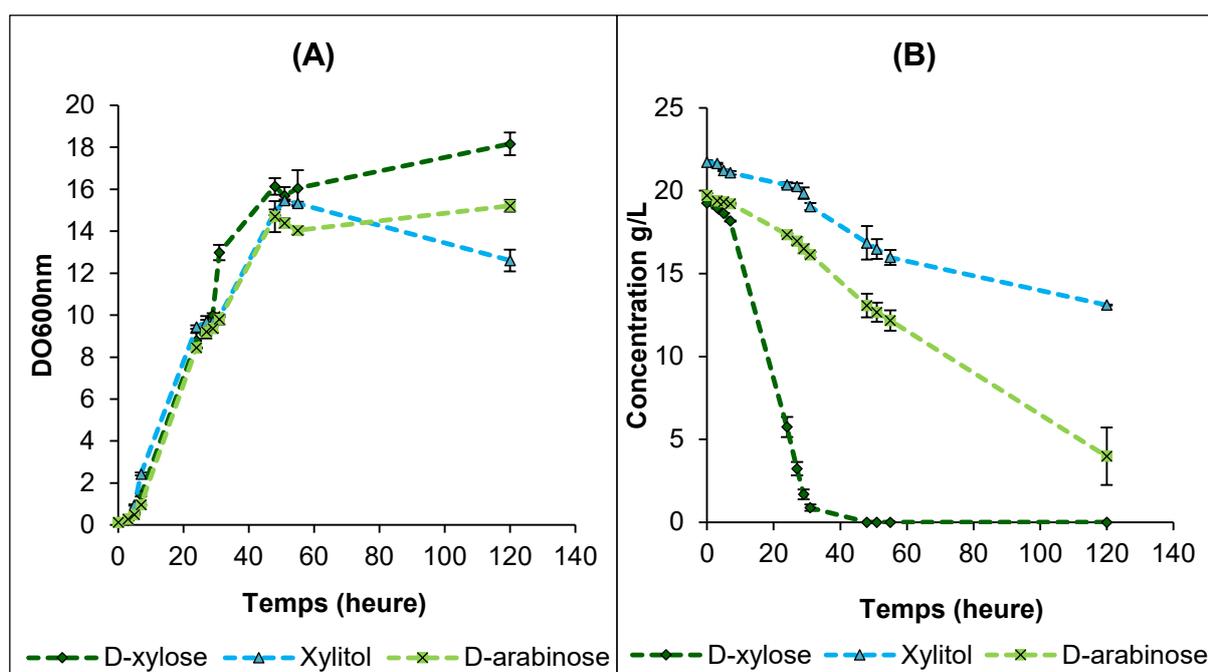
Sur mélange de xylose et de xylitol, la DO maximale enregistrée est de 21,4 à 48 h (**Figure III.20**). La croissance de *S. shehatae* sur mélange de xylose et xylitol est proche de celle sur YM xylose (DO maximale de 19,5) mais plus importante que celle sur YM xylitol (DO maximale de 12,0). La croissance exponentielle observée entre 7 et 28 h est due à l'assimilation du xylose qui est épuisé après 28 h. Une faible consommation du xylitol de 2 g/L est notée.

La production d'éthanol a eu lieu et est maximale à 1,7 g/L à 24 h. Cette production d'éthanol est issue de l'assimilation du xylose uniquement vu que la légère diminution du xylitol coïncide avec la diminution progressive de l'éthanol. Toutefois, la concentration maximale en éthanol mesurée est inférieure de celle mesurée sur le xylose seul et ceci est dû à la plus faible concentration initiale en xylose. La levure consomme l'éthanol après avoir consommé tout le xylose pour croître, ce qui est traduit par une augmentation de la DO jusqu'à 48 h.

Ces résultats montrent que même en présence du xylose dans le milieu, le xylitol n'est pas fermenté en éthanol par *S. shehatae*, ce qui dû probablement à un défaut de transport de ce dernier à l'intérieur des cellules (faible diminution de la concentration du xylitol), causé par une faible spécificité des transporteurs de pentoses vis-à-vis du xylitol et non pas à l'activation de la XDH induite par la présence du xylose.

### 3.3.2. Sur xylose, D-arabinose ou xylitol en conditions anaérobies

Les mesures spectrophotométriques obtenues lors des cultures de *S. shehatae* sur xylose, D-arabinose et xylitol en conditions anaérobies illustrées en **Figure III.21 A** montrent que la croissance a peu changé dans ces conditions. On note les  $DO_{\max 600nm}$  suivantes 18,2, 15,5 et 15,2 et sur le xylose, le xylitol et l'arabinose, respectivement (**Figure III.21 A**), alors qu'en aérobie, les  $DO_{\max 600nm}$  respectives sont de 19,5, 12,0 et 16,2.

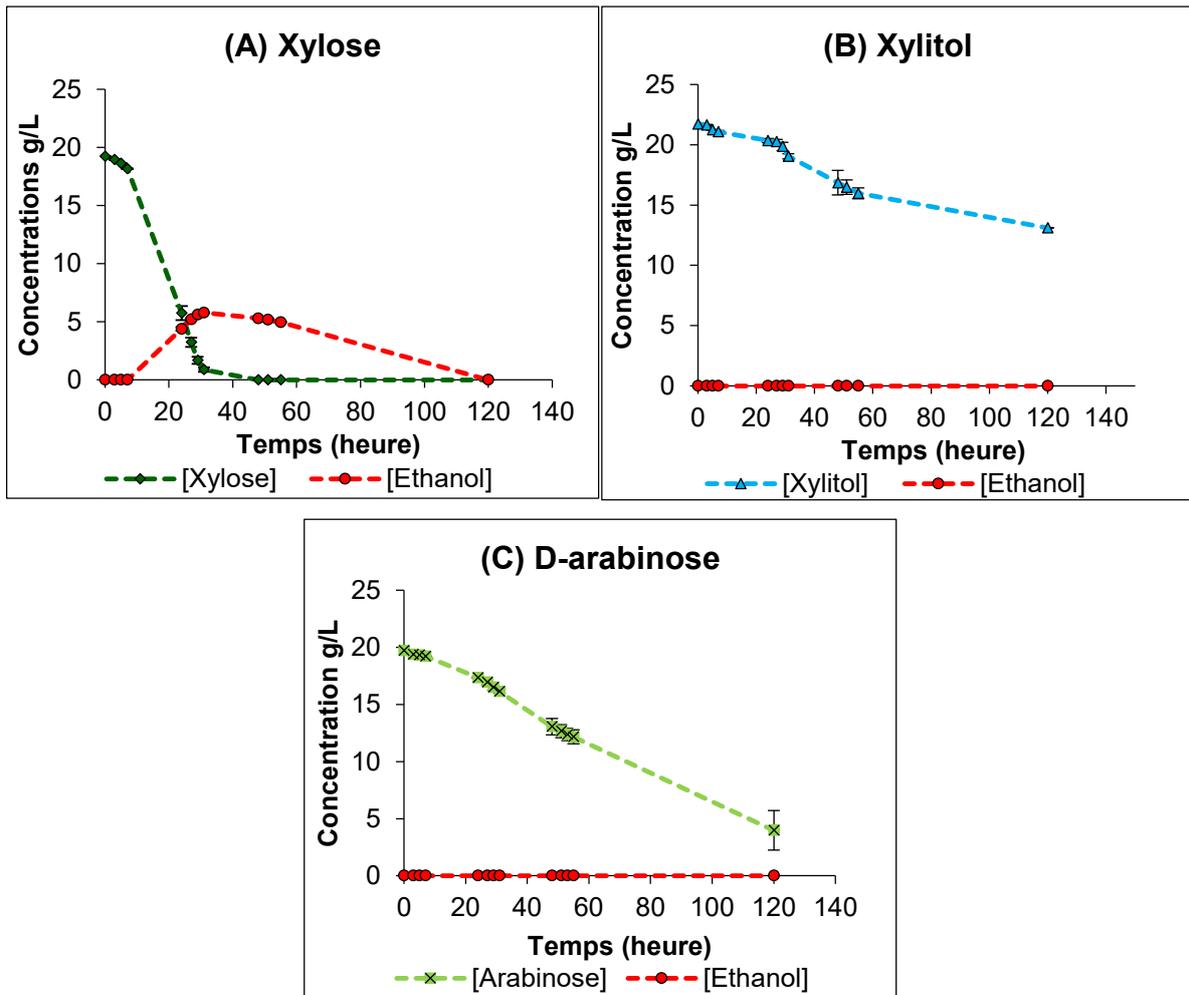


**Figure III.21.** Cinétiques de croissance **(A)** et dosage des sucres **(B)** lors de la croissance de *S. shehatae* en YM pentoses ou YM xylitol à 30°C en conditions anaérobies

Pareillement aux conditions aérobie, la consommation du xylose est plus rapide que les deux autres sucres. Après 48h, tout le xylose est consommé alors qu'il reste encore 13,1 g/L d'arabinose dans le milieu YM arabinose. Cette concentration diminue progressivement pour atteindre une concentration résiduelle à 120 h égale 3,9 g/L. Le xylitol est légèrement plus consommé qu'en aérobie vu que sa concentration

résiduelle à 120 h est égale à 13,1 g/L alors qu'elle était 16,5 g/L en aérobiose (**Figure III.21 B**).

D'autre part, seul le xylose est fermenté en éthanol par *S. shehatae* (**Figure III.22 A**) même si l'arabinose et le xylose sont consommés partiellement ou totalement (**Figure III.22 B et C**). Le maximum d'éthanol obtenu à partir de la fermentation du D-xylose est de 5,8 g/L à 31 h (**Figure III.22 A**).



**Figure III.22.** Cinétiques de consommation des sucres et production d'éthanol par *S. shehatae* sur YM xylose (**A**), YM xylitol (**B**), YM D-arabinose (**C**) à 30°C en conditions anaérobies (les barres d'erreur sont souvent incluent dans les symboles)

Ainsi, les conditions anaérobies ont permis une amélioration de rendement éthanolique par *S. shehatae* sur le xylose d'un facteur de 1,8 sans que sa croissance ne soit affectée. L'éthanol est ensuite consommé, après épuisement du xylose (t=48 h) et devient nul au temps t=120 h. Cette consommation d'éthanol après épuisement du xylose a été déjà décrite par Gírio *et al.* (1989) et Slininger *et al.* (1987).

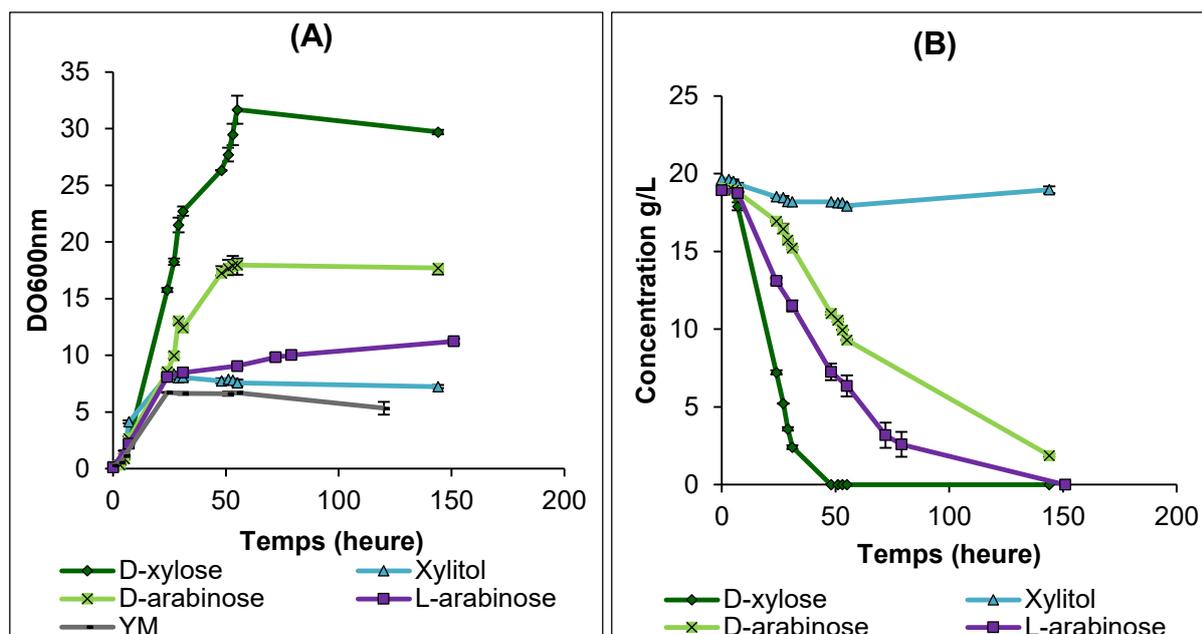
Il est généralement admis que la double spécificité de l'enzyme xylose réductase (XR) vis-à-vis des deux coenzymes NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite) et NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduite) permet la fermentation du xylose en anaérobiose (en absence de l'O<sub>2</sub> : accepteur final d'électrons) (Bruinenberg *et al.*, 1984 ; Van Dijken and Scheffers, 1986). Ceci en évitant une accumulation du NADH par la xylitol déshydrogénase (XDH) couplée au NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide oxydée). Néanmoins, une quantité limitée en oxygène est requise afin d'améliorer le taux et l'efficacité de la production d'éthanol par les levures fermentant le xylose telles que *S. shehatae* et *S. stipitis* (Sreenath *et al.*, 1986 ; Ligthelm *et al.*, 1988). Toutefois, un excès d'oxygène favorise la croissance au détriment de la fermentation éthanolique du xylose (Du Preez and van der Walt, 1983 ; Bruinenberg *et al.*, 1984). Similairement, dans notre étude, la production d'éthanol a été améliorée en conditions anaérobies sans que la croissance de la levure ne soit affectée ce qui laisse à dire que le xylose est plus efficacement utilisé par *S. shehatae* sous conditions anaérobies.

### **3.4. *Scheffersomyces stipitis***

#### 3.4.1. Conditions aérobies

##### 3.4.1.1. Sur xylose, D-arabinose, L-arabinose ou xylitol

Les mesures de la DO<sub>600nm</sub> sur milieu YM avec pentose ou xylitol ont montré que les DO<sub>600nm</sub> maximales enregistrées sont de 31,7 sur xylose, 8,3 sur xylitol, 17,6 sur D-arabinose et 11,2 sur L-arabinose (**Figure III.23 A**).

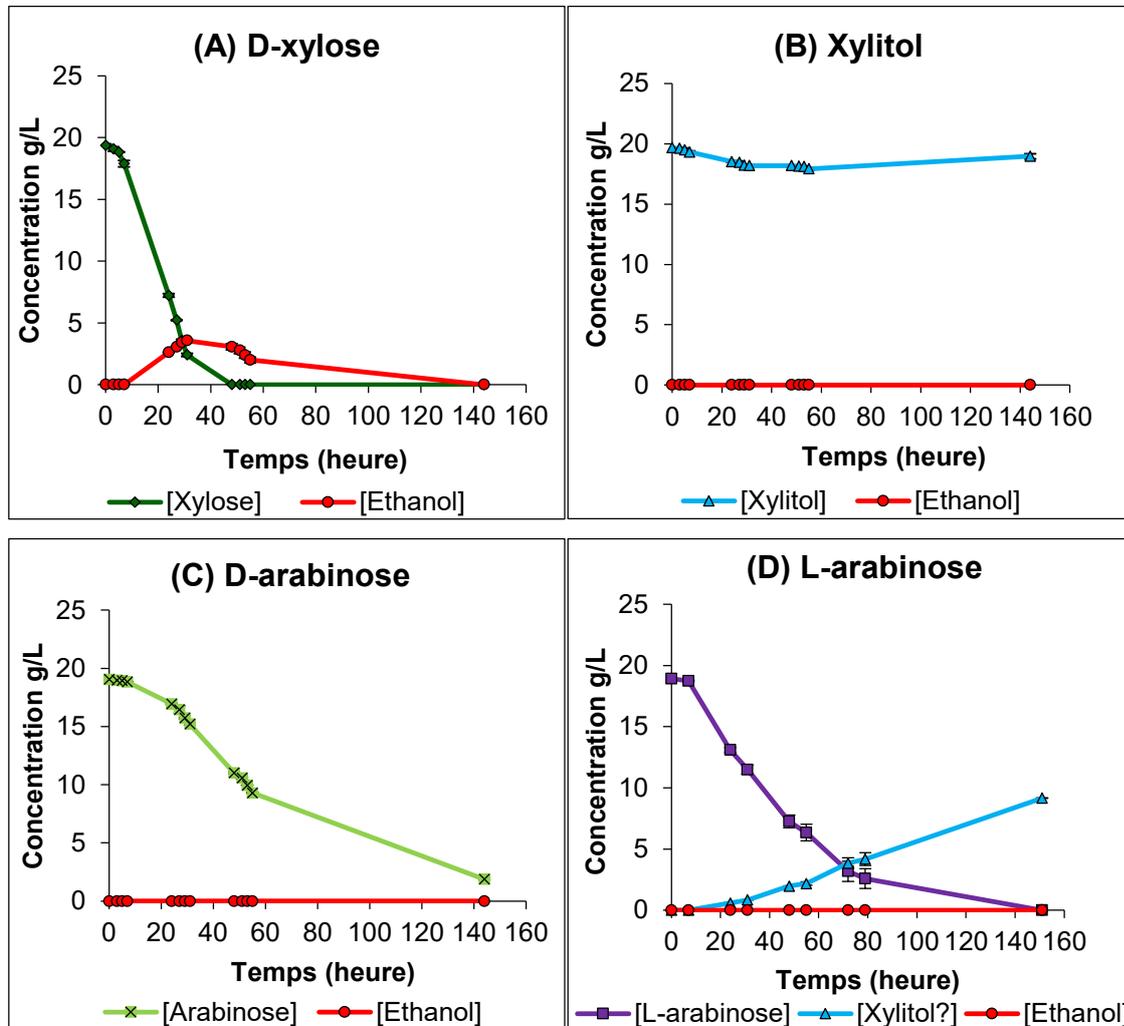


**Figure III.23.** Cinétiques de croissance (A) et dosage des sucres (B) lors de la croissance de *S. stipitis* en YM pentoses ou YM xylitol à 30°C en aérobiose

En effet, la croissance de *S. stipitis* sur YM xylose est la plus importante par rapport aux autres pentoses mais aussi par rapport au glucose (DO maximale de 25,2), déjà décrit plus haut. Cette observation a été également précisée par Rouhollah *et al.* (2007) sur *S. stipitis* CCUG18492. Par ailleurs, Du Preez *et al.* (1986) ont trouvé que *S. stipitis* CSIR-Y633 montrait des taux de croissance similaires sur glucose et xylose. Contrairement, les travaux de Agbogbo *et al.* (2006) montrent que le taux de croissance de *S. stipitis* CBS 6054 sur le glucose est plus élevé que celui sur le xylose. Comme montré dans la **Figure III.23 A**, *S. stipitis* se développe plus sur le D-arabinose que sur son énantiomère, le L-arabinose, contrairement à *S. shehatae*. Ceci malgré une consommation entière et plus rapide du L-arabinose. En outre, la croissance de *S. stipitis* sur YM xylitol est la plus faible parmi les sucres à C5 et proche de celle sur YM seul sans sucre (**Figure III.23 A**). Ceci peut être expliqué par le fait que le xylitol n'a pas été consommé par *S. stipitis* (**Figure III.23 B**), contrairement à *S. shehatae* qui consomme un peu le xylitol et par la suite a montré une croissance plus importante que *S. stipitis* sur ce sucre.

Au bout de 48 h, il ne reste plus de xylose, alors qu'il reste 11,0 g/L de D-arabinose et 7,3 g/L de L-arabinose respectivement dans le milieu YM D-arabinose et YM L-arabinose (**Figure III.23 B**).

Comme pour *S. shehatae*, la production d'éthanol a été uniquement détectée à partir de xylose où un maximum de 3,6 g/L a été mesuré à 31 h (**Figure III.24 A**). Après l'épuisement du xylose à 48 h, on note une consommation de l'éthanol par la levure qui s'annule après 120 h. Il est à noter que les maximums d'éthanol obtenus à partir du xylose par *S. stipitis* et *S. shehatae* sont proches.

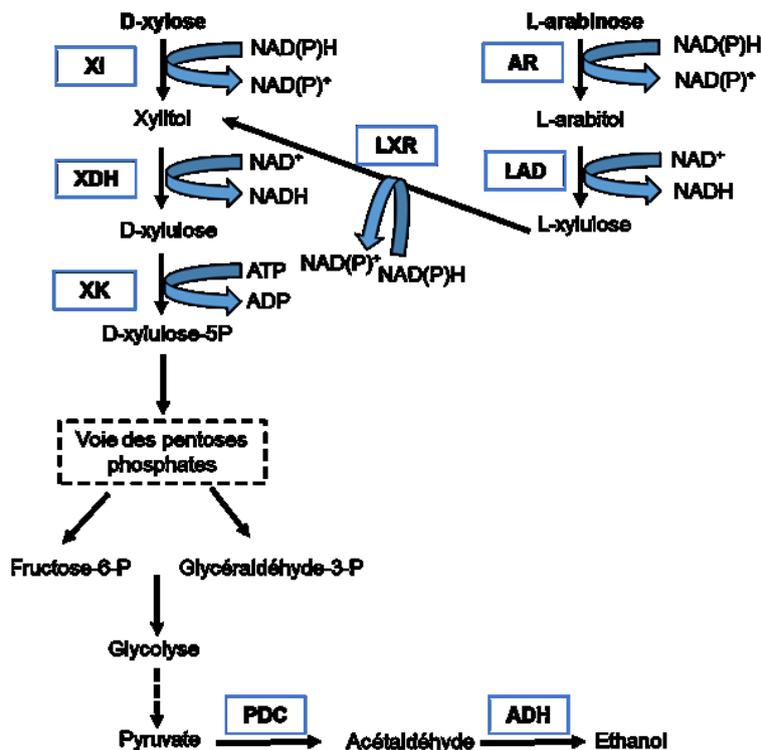


**Figure III.24.** Cinétiques de consommation des sucres et production d'éthanol par *S. stipitis* sur YM xylose (A), YM xylitol (B), YM D-arabinose (C) et YM L-arabinose (D) à 30°C en aérobiose

La souche de *S. stipitis* CLIB 187 utilisée dans notre étude est capable de fermenter le xylose en éthanol en conditions aérobies, en concordance avec les travaux de Du Preez *et al.* (1986), Agbogbo *et al.* (2006) et Rouhollah *et al.* (2007). En revanche, les souches *S. stipitis* Y7124 et *S. stipitis* CSIR-Y633 utilisées, respectivement par Delgenes *et al.* (1986) et Du Preez *et al.* (1989b) ne produisent pas d'éthanol sur le xylose en conditions aérobies.

D'autre part, sur le milieu YM L-arabinose aucune production d'éthanol n'a été enregistrée, comme dans le cas de *S. shehatae*. Cependant, la formation d'un produit qui apparaît au même temps de rétention que le L-arabitol ou le xylitol est détectée en HPLC. La concentration de ce produit formé augmente dans le milieu jusqu'à 9,2 g/L à 151 h et est largement plus élevée que dans le cas de *S. shehatae* (0,8 g/L) selon la courbe d'étalonnage établie pour le xylitol (**Figure III.24 D**). Des analyses structurales en RMN (résonance magnétique nucléaire) permettront d'identifier le produit formé.

Ainsi, l'absence de fermentation du L-arabinose en éthanol observée chez *S. stipitis* CLIB 187 est en accord avec la littérature (Dien *et al.*, 1996 ; Fonseca *et al.*, 2007 ; Gírio *et al.*, 2010). Dien *et al.* (1996) ont attribué la rareté des microorganismes fermenteurs de ce pentose au déséquilibre en cofacteurs nécessaires pour les enzymes le métabolisant et/ou à la rareté des environnements riches en L-arabinose dans la nature. Comme montré dans la **Figure III.25**, la conversion du L-arabinose en D-xylulose s'effectue en quatre étapes successives contre deux seulement dans le cas du D-xylose.



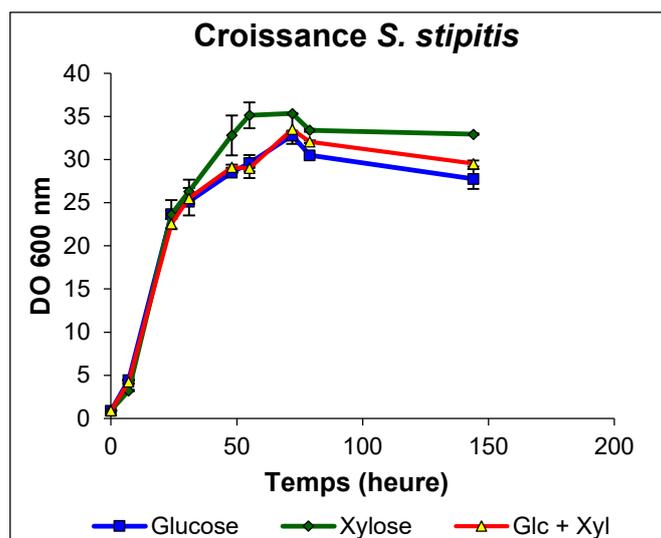
**Figure III.25.** Schéma représentant le dégradation du D-xylose et L-arabinose chez les levures. XR : D-xylose réductase, XDH : xylose déshydrogénase, XK : xylulose kinase, AR : L-arabinose réductase, LAD : L-arabitol 4-déshydrogénase, LXR : L-xylulose réductase, PDC : pyruvate décarboxylase, ADH : alcool déshydrogénase (d'après Gírio *et al.*, 2010)

Par conséquent, la formation du D-xylulose à partir du L-arabinose comparé au D-xylose nécessite un couple de NAD(P)H / NAD(P) supplémentaire, ce qui pourrait induire un déséquilibre redox et conduire par suite à une accumulation du xylitol (ou L-arabitol) dans le milieu. Ceci présenterait une hypothèse permettant d'expliquer la raison pour laquelle la conversion du L-arabinose en éthanol est rare chez les levures fermentant le D-xylose (Magee and Kosaric, 1985 ; Witteveen *et al.*, 1989 ; Fonseca *et al.*, 2007 ; Gírio *et al.*, 2010).

Enfin, il est à indiquer que l'enzyme impliquée dans la première conversion réductive du L-arabinose est une aldo-réductase non spécifique ayant comme substrats le D-xylose et le L-arabinose (Verduyn *et al.*, 1985). Ainsi, dans le cas de *S. shehatae* CLIB 1339, la concentration négligeable en produit issu de l'assimilation du L-arabinose (xylitol ou L-arabitol) pourrait être la conséquence d'une moindre affinité de l'enzyme aldo-réductase vis-à-vis du L-arabinose par rapport au D-xylose (ce qui n'est apparemment pas le cas chez *S. stipitis* CLIB 187), ou aussi d'une consommation du métabolite produit immédiatement par la levure.

#### *3.4.1.2. Sur mélange de glucose et xylose*

La croissance de *S. stipitis* est étudiée en milieu YM contenant un mélange de quantités équivalentes du glucose et du xylose (10 g/L de chaque sucre), soit une concentration finale en sucre de 20 g/L. En parallèle, des cultures de *S. stipitis* en milieu YM glucose et YM xylose ont été lancées simultanément. La préculture en phase exponentielle en milieu YM glucose + xylose a été utilisée pour inoculer les différentes cultures de *S. stipitis*, dans le but de préparer les levures aux deux substrats. Les valeurs de DO<sub>600nm</sub> mesurées au cours du temps pour les 3 milieux testés sont présentées dans la **Figure III.27**.



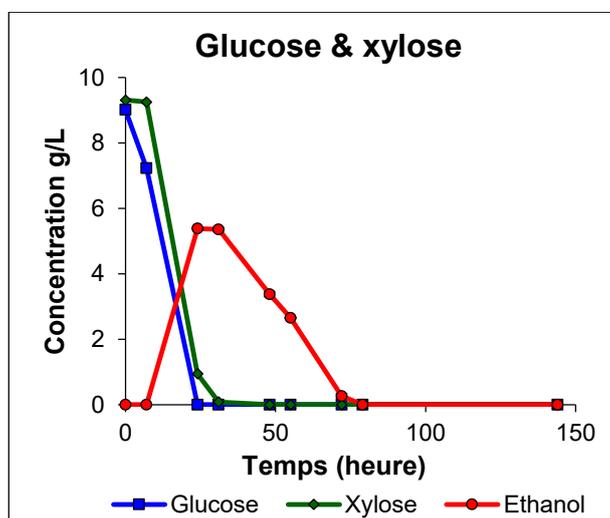
**Figure III.27.** Cinétique de croissance de *S. stipitis* en milieu YM glucose, YM xylose ou YM avec mélange de glucose et de xylose à 30°C en aérobiose

Les allures des courbes de croissance de *S. stipitis* sur les 3 milieux testés sont proches. En effet, on note une DO maximale égale à 35,3 sur le xylose, 32,7 sur le glucose et 33,5 sur le mélange de glucose et xylose. Au moment où la consommation des sucres est observée, la concentration en éthanol est maximale et égale à 6,6, 3,8 et 5,4 g/L sur le glucose, le xylose et le mélange des deux, respectivement (**Tableau III.4**). La meilleure production d'éthanol est observée sur le glucose, ce qui est bien en concordance avec ce qu'on a conclu précédemment que le glucose est le meilleur substrat éthanologique pour *S. stipitis* et les autres souches de levures utilisées dans cette étude. La concentration maximale d'éthanol à partir du mélange de sucres se situe entre celles obtenues sur le milieu YM xylose et YM glucose. Pour les 3 cas étudiés, il y a eu consommation l'éthanol produit après épuisement de sucres jusqu'à ce qu'il devienne nul en fin de cultures.

**Tableau III.4.** Croissances et concentrations maximales en éthanol obtenues avec *S. stipitis* à 30°C en aérobiose

	<b>Glucose + xylose (chacun à 10 g/L)</b>	<b>Glucose (20 g/L)</b>	<b>Xylose (20 g/L)</b>
DO <sub>600nm</sub> max	33,5 (± 1,7)	32,8 (± 0,4)	35,3 (± 0,0)
[Ethanol] max g/L	5,4 (± 0,0)	6,6 (± 0,4)	3,8 (± 0,5)

Concernant la répression catabolique exercée par le glucose sur le xylose, les résultats de dosage du glucose et du xylose permettent de constater que le glucose est consommé préférentiellement vu qu'après 7 h, sa concentration dans le milieu commence à diminuer alors que celle du xylose reste encore constante (**Figure III.28**).

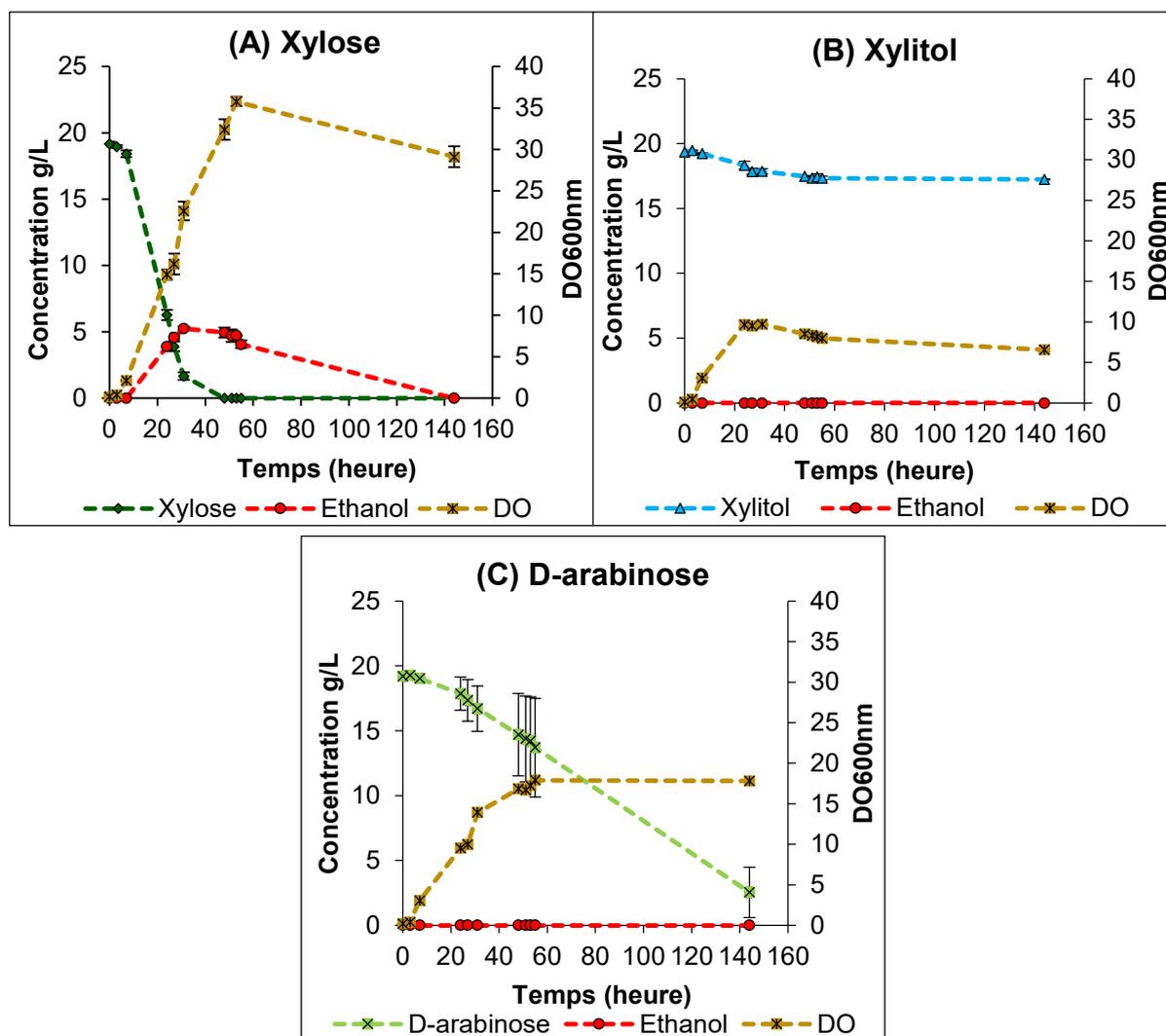


**Figure III.28.** Consommation du glucose et du xylose et production d'éthanol par *S. stipitis* en milieu YM avec mélange de glucose et de xylose à 30°C en aérobie

Dans ce contexte, Du Preez *et al.* (1986) et Agbogbo *et al.* (2006) ont observé que la consommation du xylose par *S. stipitis* n'a eu lieu que lorsque le glucose ou les autres hexoses présents dans le milieu sont épuisés. Cependant, dans notre étude, la consommation des 2 sucres a eu lieu dans la période située entre 10 h et 20 h durant laquelle aucun prélèvement n'est fait pour des raisons pratiques. Ces observations ne donnent pas donc des résultats concluants quant à la répression catabolique du glucose par la souche de *S. stipitis* CLIB 187 utilisée.

### 3.4.2. Sur xylose, D-arabinose ou xylitol en conditions anaérobies

Les résultats de suivi de la DO<sub>600nm</sub> ont montré que les DO maximales sont de 31,7 sur le xylose, 9,7 sur le xylitol et 17,9 sur le D-arabinose (**Figure III.29**).



**Figure III.29.** Cinétique de croissance et consommation du xylose et production d'éthanol par *S. stipitis* en YM xylose (A) YM xylitol (B) et YM D-arabinose (C) à 30°C en conditions anaérobies

Ces résultats permettent de constater que la croissance de *S. stipitis* n'a pas été affectée en limitant la quantité d'oxygène avec toutefois une croissance significativement importante sur le xylose (**Figure III.29 A**). Comme en aérobiose, la croissance sur le xylitol était la plus faible (**Figure III.29 B**), légèrement plus élevée que celle sur le milieu YM seul (DO maximale de 6,7).

Quant à la consommation des sucres, il est noté que tout le xylose est épuisé après 48 h, similairement aux conditions aérobies (**Figure III.29 A**). Le D-arabinose est presque totalement consommé mais moins vite que le xylose ( $[\text{arabinose}]_{120\text{h}} = 2,5 \text{ g/L}$ ) (**Figure III.29 C**) alors qu'une très faible consommation du xylitol a été constatée ( $[\text{xylitol}]_{120\text{h}} = 17,2 \text{ g/L}$ ). Toutefois, cette légère consommation du xylitol n'a

pas été observée en aérobiose, ce qui explique la DO max légèrement plus élevée par rapport aux conditions aérobies.

La production d'éthanol se produit sur le xylose uniquement avec un maximum d'éthanol de 5,2 g/L au temps  $t = 31$  h. L'éthanol est ensuite consommé, après épuisement du xylose ( $t = 48$  h) et s'annule au temps  $t = 120$  h (**Figure III.29 A**).

Ainsi, l'anaérobiose a permis une amélioration de la fermentation éthanolique du xylose par *S. stipitis* comme pour *S. shehatae* sans que la croissance des levures ne soit affectée. Ces résultats rejoignent ceux rapportés précédemment par Delgenes *et al.* (1986) qui ont précisé que plus la concentration d'oxygène dissout est faible, plus la production d'éthanol par *S. stipitis* est améliorée. Ils ont déclaré que la levure *S. stipitis* produisait de l'éthanol avec un rendement de 0,4 g/g de xylose. De même, (Du Preez *et al.*, 1989a) ont indiqué que le meilleur rendement en éthanol sur le xylose par *S. stipitis* a été constaté en conditions anoxiques.

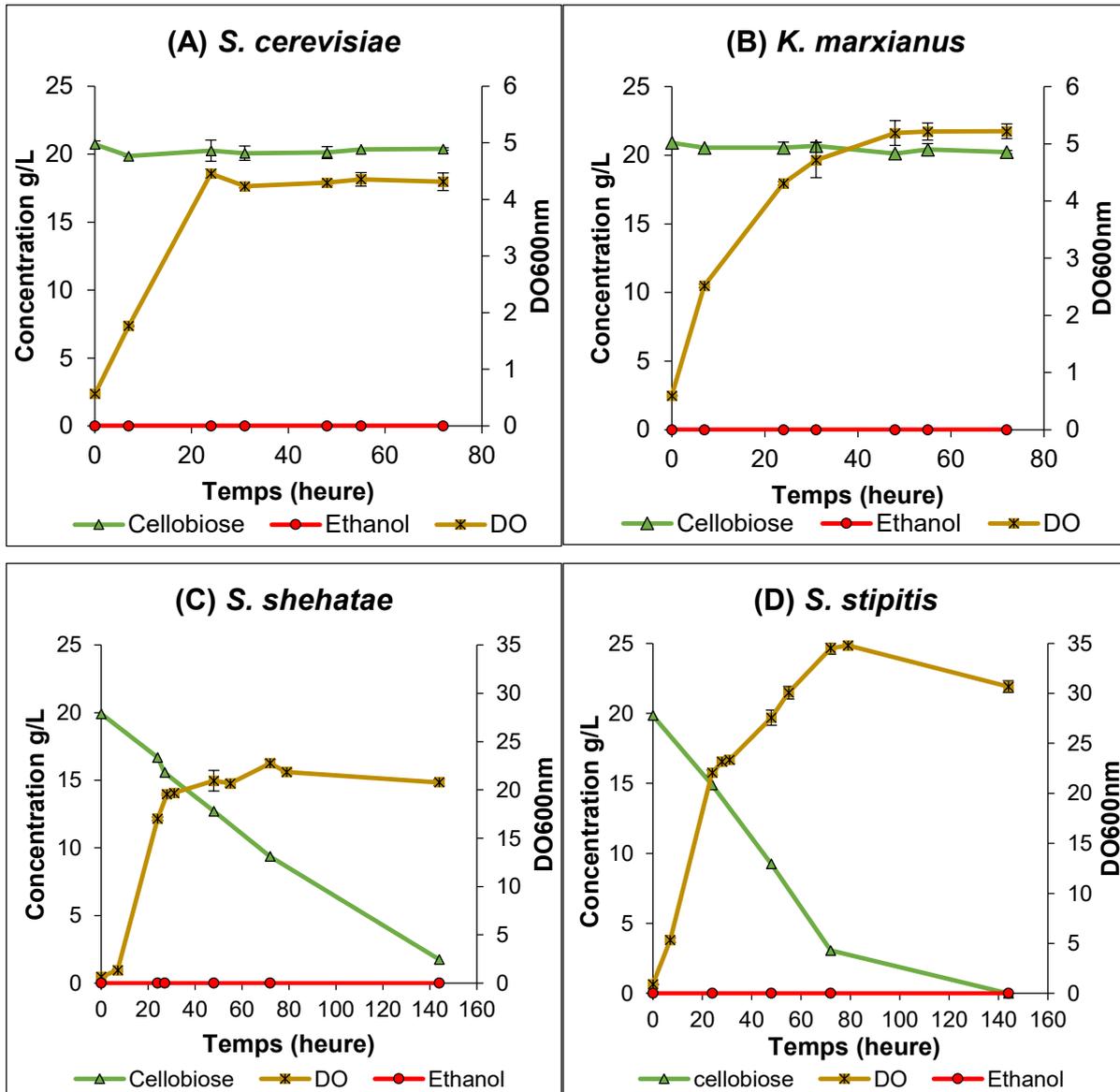
#### **4. Cultures des levures sur cellobiose**

La conversion de la cellulose constitutive de la BLC en bioéthanol est accomplie par un prétraitement de la BLC suivi d'une hydrolyse enzymatique (ou chimique). L'hydrolyse enzymatique implique l'utilisation des cellulases qui sont le plus souvent pauvres en  $\beta$ -glucosidases (dans les souches sauvages dont *Trichoderma reesei*) : enzymes responsables de la conversion du cellobiose, disaccharide de glucose en monomères de glucose (Sánchez and Cardona, 2008 ; Menon and Rao, 2012 ; Singhanian *et al.*, 2013). Ceci pourrait entraîner une accumulation du cellobiose qui exerce à son tour une inhibition des enzymes notamment les exoglucanases et réduit le taux d'hydrolyse global (Singhanian *et al.*, 2017). Ainsi, le cellobiose représente un produit de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose qui peut être plus ou moins accumulé dans le milieu et le fait que ce dissacharide soit fermenté en éthanol par des levures pourrait être important pour l'exploitation commerciale du bioéthanol à partir de la BLC.

En se basant sur la littérature, quelques levures fermentant le cellobiose ont été identifiées appartenant notamment aux espèces de *Torulopsis*, *Brettanomyces* et *Candida*. D'autres études ont précisé que les levures qui fermentent le cellobiose présentent une faible capacité de fermenter le xylose (Maleszka *et al.*, 1982). Par

ailleurs, certaines levures qui fermentent le xylose en éthanol ont été rapportées comme étant capables de fermenter le cellobiose en éthanol avec des rendements largement variables. En effet, Toivola *et al.* (1984) ont trouvé que la souche de *Candida tenuis* CBS 4435 est capable de fermenter le cellobiose (présent dans le milieu à 2% m/v) mais avec un rendement éthanologique faible de 10%, alors que le rendement éthanologique sur le xylose (présent dans le milieu à 2% m/v) est de 62,6%. Cependant, les travaux de Du Preez *et al.* (1986) ont montré que la souche de *S. stipitis* CSIR-Y633 dont le rendement éthanologique sur xylose (2% m/v) est de 76,3%, produit aussi un rendement élevé en éthanol (62,6%) sur le cellobiose (2% m/v).

Pour ces raisons, la capacité des levures utilisées dans notre étude : *S. cerevisiae* YSC2 Type II, *K. marxianus* UMIP 2234.94, *S. shehatae* CLIB 1339 et *S. stipitis* CLIB 187, à fermenter le cellobiose a été testée. Les résultats obtenus sur cultures de ces quatre espèces de levures sur YM cellobiose sont montrés en **Figure III.30**.



**Figure III.30.** Cinétique de croissance et dosage du cellobiose et de l'éthanol lors des cultures de *S. cerevisiae* (A), *K. marxianus* (B), *S. shehatae* (C) et *S. stipitis* (D) en YM cellobiose (20 g/L), à 30°C en aérobiose

La levure *S. cerevisiae* ne produit pas d'éthanol sur le cellobiose puisque ce dernier n'a pas été consommé par la levure (**Figure III.30 A**). La DO<sub>600nm</sub> maximale mesurée après 24 h est de 4,5 (proche de la DO maximale obtenue sur le milieu YM seul : 4,0) et est significativement inférieure en comparaison avec celle mesurée sur YM hexoses (DO maximale de 14,5, 15,7 et 14,1 sur glucose, galactose et mannose, respectivement). Ces résultats obtenus confirment ce qui est rapporté dans la littérature que *S. cerevisiae* de type sauvage n'est pas capable d'assimiler le cellobiose par manque de transporteurs du cellobiose et également de  $\beta$ -glucosidases (capables

d'hydrolyser le cellobiose en glucose) (Van Rooyen *et al.*, 2005 ; Ha *et al.*, 2011 ; Ha *et al.*, 2013).

De même, *K. marxianus* UMIP 2234.94 s'est montrée incapable d'assimiler le cellobiose dont la concentration dans le milieu de culture reste constante ce qui a impliqué une faible croissance de *K. marxianus* sur ce milieu (DO<sub>600nm</sub> maximale de 5,2 après 72 h) (**Figure III.30 B**) relativement à celle obtenue sur YM hexoses (DO maximale autour de 20). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Fonseca *et al.* (2013) qui ont trouvé que *K. marxianus* CBS 6556 n'est pas capable d'assimiler le cellobiose (présent à 10 g/L). En revanche, Barron *et al.* (1994) ont étudié la croissance et la production d'éthanol par la levure thermotolérante *K. marxianus* IMB3 (à 45°C) sur cellobiose avec ou sans supplémentation du milieu de culture en  $\beta$ -glucosidases exogènes (d'origine fongique). *K. marxianus* IMB3 s'est montrée capable de se développer sur le milieu contenant du cellobiose (2% m/v) mais sa croissance est plus faible sur cellobiose que sur glucose (Barron *et al.*, 1994). En outre, *K. marxianus* IMB3 produit très faiblement de l'éthanol (rendement maximal de 10%) à partir du cellobiose alors que le rendement éthanolique sur glucose est de 68% (Barron *et al.*, 1994). Bien que *K. marxianus* IMB3 s'est montrée capable de produire des  $\beta$ -glucosidases, la supplémentation du milieu en  $\beta$ -glucosidases exogènes augmente la croissance et également la production éthanolique (rendement maximal de 62%) par *K. marxianus* IMB3 sur le cellobiose (Barron *et al.*, 1994). Ceci permet de suggérer que la faible assimilation du cellobiose sans ajout de  $\beta$ -glucosidases exogènes est probablement dû à un manque de transporteurs spécifiques du cellobiose chez *K. marxianus* IMB3. Ainsi, dans notre étude, on peut assumer que *K. marxianus* UMIP 2234.94 est incapable de consommer le cellobiose par manque de transporteurs de ce dernier vu qu'il n'a pas été transporté à l'intérieur des cellules, couplée ou non à l'absence de  $\beta$ -glucosidases chez *K. marxianus* UMIP 2234.94.

Néanmoins, les deux autres levures *S. shehatae* CLIB 1339 et *S. stipitis* CLIB 187 ont montré sur le milieu YM cellobiose des profils de croissance différents par rapport aux deux levures décrites plus haut : *S. cerevisiae* et *K. marxianus*. En effet, la levure *S. shehatae* se développe bien sur le milieu YM cellobiose où la DO<sub>600nm</sub> maximale est de 21,8. Comme montré dans la **Figure III.30 C**, *S. shehatae* consomme presque totalement le cellobiose présent initialement à 20 g/L. Cependant, *S. shehatae* ne montre aucune production d'éthanol à partir du cellobiose. La consommation de ce

disaccharide a donc contribué à la croissance de *S. shehatae*. Ces résultats sont en concordance avec d'autres études. Du Preez *et al.* (1986) ont montré que la levure *S. shehatae* CSIR-Y492 (CBS 2779) consomme le cellobiose pour sa croissance mais sans production d'éthanol. De même, des observations similaires ont été rapportées par Parekh and Wayman (1986) sur deux autres souches de *S. shehatae* CSIR-II7 et CSIR-57.

Similairement, *S. stipitis* consomme entièrement le cellobiose pour en faire de la biomasse cellulaire sans aucune production d'éthanol. En effet, la croissance de *S. stipitis* présente une croissance importante avec une  $DO_{600nm}$  maximale de 34,8 (**Figure III.30 D**). Toutefois, il est remarquable que la vitesse de consommation du cellobiose par *S. stipitis* est plus rapide que celle chez *S. shehatae*. Ceci permet de constater que *S. stipitis* consomme le cellobiose plus efficacement que *S. shehatae*. Cependant, les souches de *S. stipitis* utilisées par Du Preez *et al.* (1986) (*S. stipitis* CSIR-Y633) et Parekh and Wayman (1986) (*S. stipitis* CBS 5776) produisent de l'éthanol à partir du cellobiose avec des rendements éthanoliens respectifs de 62,6 et 80,2%. Ces résultats mettent en évidence que la capacité et l'efficacité des levures à produire de l'éthanol à partir du cellobiose seraient dépendantes de la souche de levure.

Ainsi, les quatre levures utilisées dans notre étude ne sont pas capables de produire de l'éthanol à partir du cellobiose mais seules les levures *S. shehatae* et *S. stipitis* le consomment entièrement et s'en servent pour la croissance. Or, dans un procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique (notamment par *S. shehatae* et *S. stipitis*) s'il y a accumulation du cellobiose, sa consommation par les levures (sans production d'éthanol) pourrait présenter une compétition avec sa consommation en tant que substrat des  $\beta$ -glucosidases et ainsi diminuer les rendements éthanoliens.

## **5. Effet de faibles concentrations en liquides ioniques sur la croissance et la production d'éthanol par *S. stipitis***

Le procédé de production de bioéthanol de deuxième génération à partir de la BLC débute généralement par une étape de prétraitement de la BLC suivie de l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides et la fermentation microbienne des monosaccharides libérés (par des levures dans notre cas). Dans notre étude, le

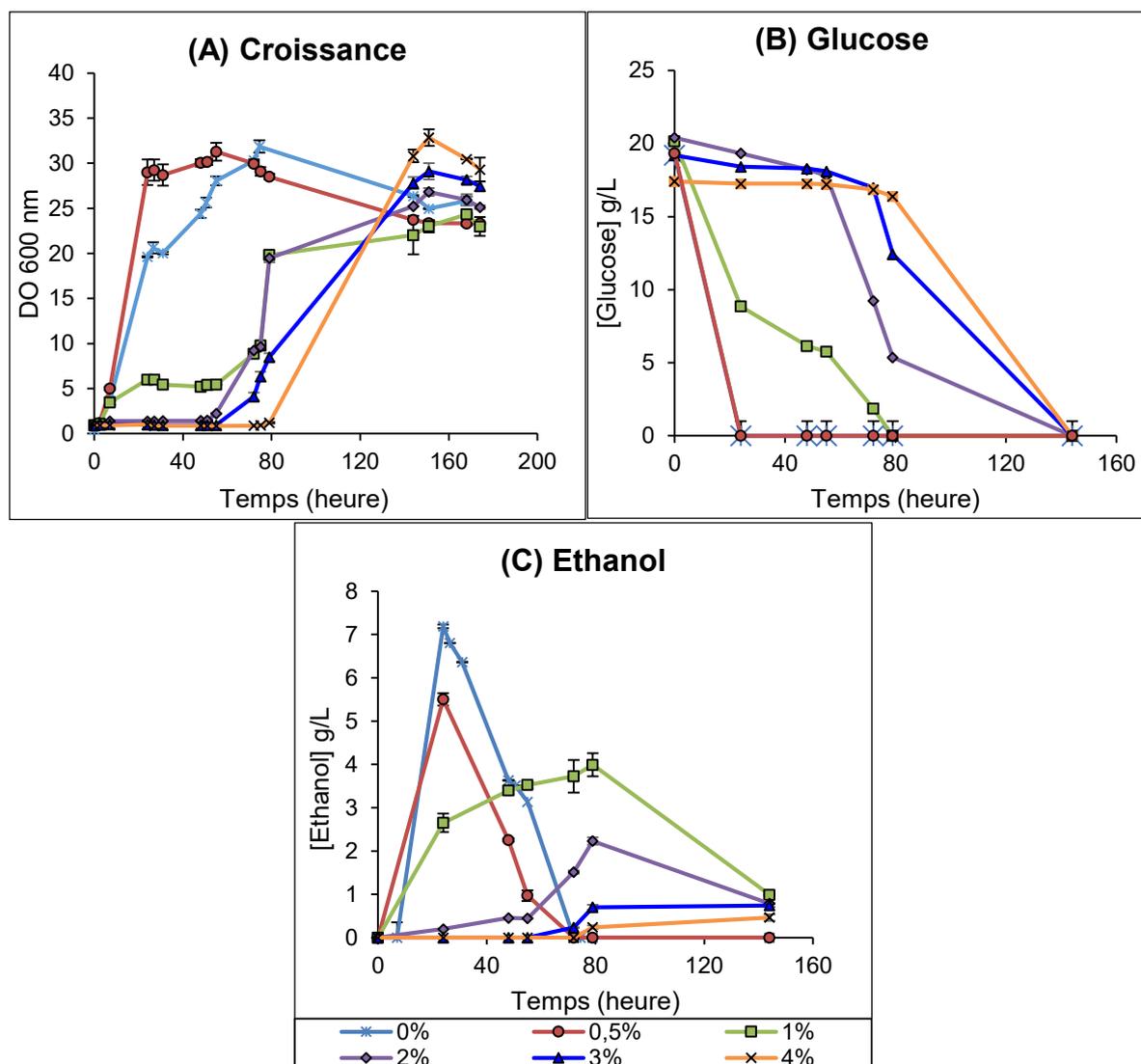
prétraitement de la (ligno)cellulose est effectué par l'un des deux LI hydrophiles dérivés d'imidazolium : le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Les LI sont des solvants permettant un prétraitement efficace de la (ligno)cellulose (Auxenfans *et al.*, 2014a ; Elgharbawy *et al.*, 2016 ; Auxenfans *et al.*, 2017) et sont considérés plus biocompatibles que les solvants organiques classiques (Van Rantwijk and Sheldon, 2007 ; Pham *et al.*, 2010). Cependant, un effet toxique a pu être observé sur les cellules microbiennes dû au LI résiduel (estimé entre 0,1 et 10%) (Husson *et al.*, 2011) qui reste piégé dans la BLC prétraitée même après lavage intensif (Sitepu *et al.*, 2014 ; Dickinson *et al.*, 2016).

Dans nos études antérieures, l'effet de faibles concentrations d'[Emim][OAc] ou d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] dans le milieu YM glucose a été testé sur les deux levures *S. cerevisiae* YSC2 Type II (Mehmood *et al.*, 2015) et *K. marxianus* UMIP 2234.94 (Mehmood *et al.*, 2018). Les résultats obtenus sur *K. marxianus* seront présentés en annexe sous forme d'article, publié en 2018 dans le journal « *International Journal of Molecular Sciences* ». Brièvement, les résultats de ces études ont montré que *S. cerevisiae* tolère jusqu'à 0,5% d'[Emim][OAc] et 1% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Mehmood *et al.*, 2015) tandis que *K. marxianus* présente une tolérance plus élevée : 2% d'[Emim][OAc] et 6% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Mehmood *et al.*, 2018). L'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] s'est montré plus biocompatible que l'[Emim][OAc] pour *S. cerevisiae* aussi bien que pour *K. marxianus*. Ceci met en évidence l'effet prépondérant de l'anion constitutif du LI puisqu'il s'agit du même cation (imidazolium) dans les deux LI. Comme décrit dans le premier chapitre (étude bibliographique), la paroi des levures est constituée principalement de trois polysaccharides : mannanes, glucanes et chitine, en proportions variables selon les espèces (Nguyen *et al.*, 1998 ; Klis *et al.*, 2002 ; Aguilar-Uscanga and François, 2003 ; Bowman and Free, 2006). Par conséquent, les LI peuvent interagir avec la paroi cellulaire des levures comme sur les polysaccharides de la BLC. En outre, il est rapporté que des perturbations au niveau de la paroi cellulaire des levures peuvent causer des lésions ou des morts cellulaires (Bowman and Free, 2006). Ainsi, l'ion acétate semblerait interagir plus fortement que le méthylphosphonate avec les polysaccharides des parois de *S. cerevisiae* et *K. marxianus* entraînant une déstructuration plus importante des parois cellulaires.

Sur la base de nos résultats mentionnés plus haut dans ce chapitre, les levures *S. shehatae* et *S. stipitis* étant capables de fermenter à la fois les hexoses et le xylose pourraient être des candidates intéressantes pour la fermentation des hydrolysats enzymatiques de la BLC prétraitée préalablement aux LI. C'est pourquoi des cultures de *S. stipitis* en milieu YM glucose en présence de différentes concentrations d'[Emim][OAc] ou d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (de 0,5 à 4% (v/v)) sont réalisées dans le but de tester l'effet du LI résiduel sur la croissance, la consommation du glucose et la production de l'éthanol par cette levure. Cependant, faute de temps, l'effet de ces deux LI sur *S. shehatae* n'a pas été testé. Seuls les résultats obtenus sur *S. stipitis* sont présentés ci-dessous.

### 5.1. [Emim][OAc]

L'impact du LI est évalué tout d'abord sur la croissance de levures représentée dans la **Figure III.31 A** par le suivi de la DO<sub>600nm</sub> pendant 174 h.



**Figure III.31.** Cinétique de croissance (A), consommation du glucose (B) et production d'éthanol (C) par *S. stipitis* en milieu YM glucose seul (0% [Emim][OAc]) et YM glucose avec [Emim][OAc] de 0,5 jusqu'à 4% (v/v) à 30°C

En absence d'[Emim][OAc], la souche *S. stipitis* croît sur le milieu YM glucose après une phase de latence de 3 h environ jusqu'à une DO maximale de 31,8 mesurée à 75 h. Les allures des courbes de croissance en milieu YM glucose sans LI et avec 0,5% du LI sont similaires. La présence de 0,5% d'[Emim][OAc] dans le milieu YM glucose donne une DO maximale de 30,1 à 55 h, après une période de latence identique à celle sans LI. En revanche, au-delà de 0,5% d'[Emim][OAc], la présence du LI dans le milieu de culture prolonge la phase de latence (55 h) et retarde la croissance de *S. stipitis*. En effet, plus le pourcentage du LI augmente dans le milieu YM glucose, plus la phase de latence est longue (79 h pour 4% d'[Emim][OAc]). Mais après la phase de latence proportionnelle au pourcentage du LI, *S. stipitis* croît

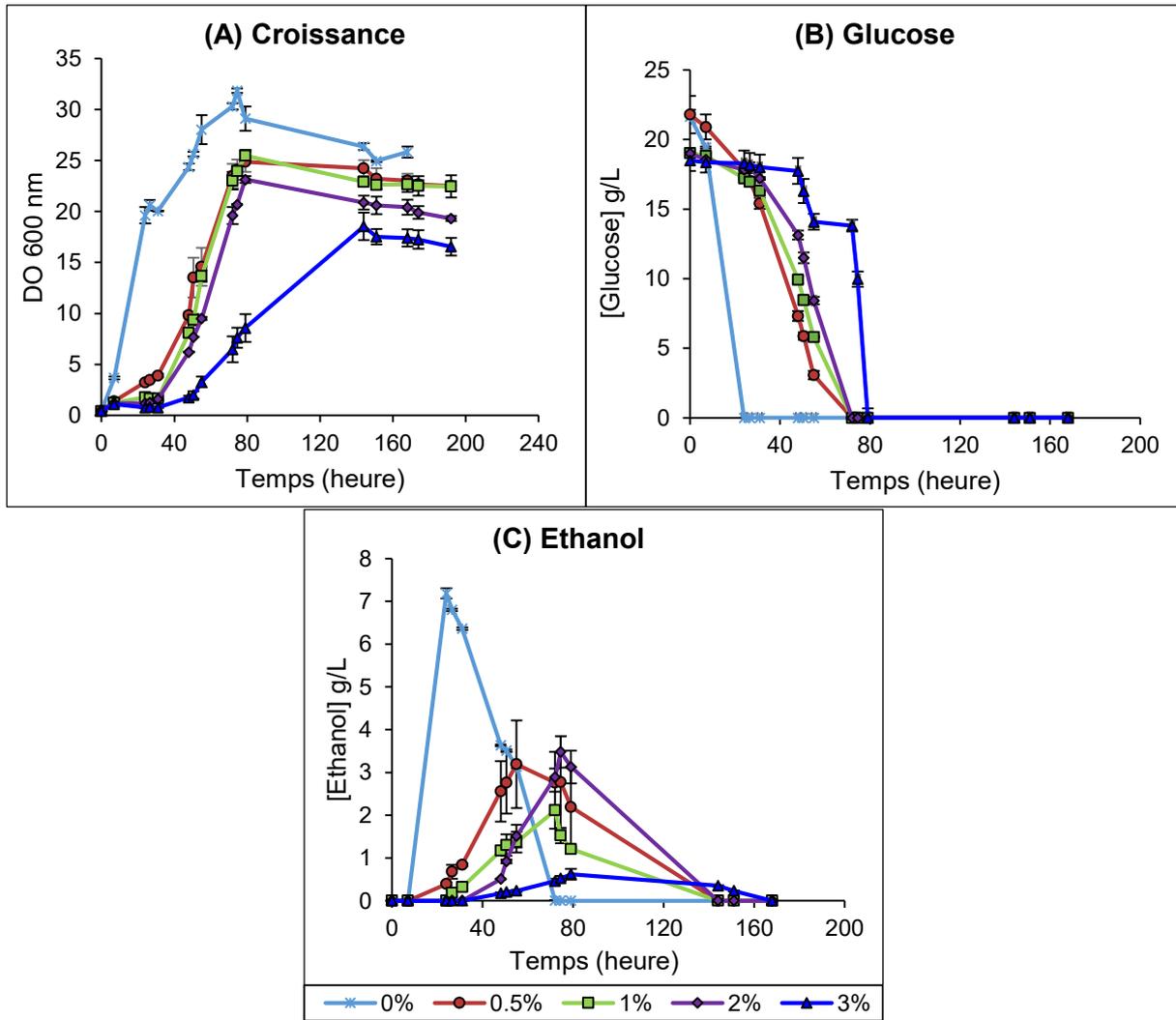
jusqu'à une DO maximale de 24, 27, 29 et 33 en présence de 1, 2, 3 et 4% d'[Emim][OAc], respectivement.

Après 24 h, tout le glucose présent dans le milieu YM glucose sans LI ou avec 0,5% du LI est consommé. Mais au-delà de 0,5% du LI dans le milieu, la consommation du glucose est dépendante du pourcentage du LI dans le milieu : plus le pourcentage d'[Emim][OAc] augmente, plus la consommation du glucose commence tardivement pour être ensuite entièrement consommé quel que soit le pourcentage du LI (**Figure III.31 B**).

La fermentation éthanolique par *S. stipitis* est affectée par la présence du LI dans le milieu de culture. Sans LI, la concentration maximale d'éthanol atteinte est de 7,2 g/L mesurée après 24 h (**Figure III.31 C**) c'est-à-dire quand le glucose est complètement épuisé. Lorsque l'[Emim][OAc] est ajouté au milieu YM glucose à 0,5% (v/v) de, la production d'éthanol baisse légèrement avec une concentration maximale de 5,5 g/L à 24 h. Plus on augmente le pourcentage en [Emim][OAc], plus le maximum d'éthanol produit diminue : 4,0 - 2,2 - 0,7 et 0,2 en présence de 1, 2, 3 et 4% d'[Emim][OAc], respectivement (**Figure III.31 C**). Une fois le maximum atteint, l'éthanol est consommé par les levures pour devenir nul sur milieu YM glucose et YM glucose avec 0,5% d'[Emim][OAc] (après 55 et 72 h, respectivement). Mais au-delà de 0,5% de LI, les concentrations résiduelles en éthanol après 144 h sont de 1,0, 0,8, 0,7 et 0,5 g/L en présence de 1, 2, 3 et 4% d'[Emim][OAc], respectivement ce qui est corrélé avec la production tardive d'éthanol en comparaison avec les deux autres conditions (YM glucose seul et YM glucose avec 0,5% [Emim][OAc]).

## 5.2. [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]

En absence d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], *S. stipitis* pousse en YM glucose à une DO maximale de 31,8 mesurée à 75 h et la phase de latence dure environ 3 h (**Figure III.32 A**).



**Figure III.32.** Cinétique de croissance **(A)**, consommation du glucose **(B)** et production d'éthanol **(C)** par *S. stipitis* en milieu YM glucose seul (0% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]) et YM glucose avec [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] de 0,5 jusqu'à 3% (v/v) à 30°C

En présence du LI, on observe que plus le pourcentage du LI augmente dans le milieu YM glucose, plus la phase de latence est longue. Mais après la phase de latence proportionnelle au pourcentage du LI, *S. stipitis* croît jusqu'à une DO maximale de 25, 25, 23 et 19 en présence de 0,5 ; 1 ; 2 et 3% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. On constate alors que la DO maximale mesurée décroît en augmentant le pourcentage d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] dans le milieu YMD (**Figure III.32 A**).

Après 24 h, tout le glucose présent dans le milieu YM glucose sans LI est consommé. En présence du LI, la consommation du glucose est de plus en plus ralentie quand le pourcentage d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] augmente, pour être ensuite entièrement consommé dans toutes les conditions expérimentales (**Figure III.32 B**).

Pour le contrôle sans [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], le maximum d'éthanol de 7,2 g/L est observé quand il n'y a plus du glucose dans le milieu (**Figure III.32 C**). L'augmentation du pourcentage en [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] engendre une diminution de la production d'éthanol, En effet, on note une concentration maximale d'éthanol de 3,2 ; 2,1 ; 3,5 et 0,6 en présence de 0,5 ; 1 ; 2 et 3% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement (**Figure III.32 C**). L'éthanol est consommé après épuisement du glucose dans le milieu pour devenir nul.

Les deux LI testés affectent la croissance de la levure *S. stipitis* en la retardant et en prolongeant la phase de latence, mais la présence du LI jusqu'à 4% d'[Emim][OAc] (DO maximale de 32,9) et 3% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (DO maximale de 18,5) n'empêche pas la croissance de *S. stipitis*. Les travaux effectués au sein de notre laboratoire par Mehmood *et al.* (2015) sur *S. cerevisiae* ont montré un effet similaire de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] dont 1% retardait la phase exponentielle de croissance de 24 h. Cependant, *S. stipitis* possède une meilleure tolérance vis-à-vis de ces LI que *S. cerevisiae*. En effet, une concentration de 0,5% d'[Emim][OAc] ou 1% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] avait un effet létal sur *S. cerevisiae*. Par ailleurs, Mehmood *et al.* (2018) ont démontré que *K. marxianus* tolère jusqu'à 2% d'[Emim][OAc] ou 6% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ainsi, *S. stipitis* présente également une meilleure tolérance vis-à-vis d'[Emim][OAc] en comparaison avec *K. marxianus*. Or, pour l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], la concentration maximale testée sur *S. stipitis* est de 3% v/v alors que des concentrations jusqu'à 6% v/v ont été testées dans le cas de *K. marxianus*, ce qui rend difficile la comparaison. Ganske and Bornscheuer (2006) ont décrit une différente tolérance des microorganismes vis-à-vis du 1-butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate, [Bmim][PF<sub>6</sub>]. La croissance de *Pichia pastoris* n'est pas affectée jusqu'à une concentration de 10% (v/v) d'[Bmim][PF<sub>6</sub>] dans le milieu, tandis que *Bacillus cereus* tolère bien 1% de ce LI qui est bactéricide pour *Escherichia coli* au-delà de 0,7%. Ces résultats appuient nos observations sur la différence de tolérance de *S. cerevisiae* et *S. stipitis* vis-à-vis de l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].

D'autre part, la présence de LI dans le milieu YM glucose que ce soit l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], aboutit à la diminution de la production éthanolique par *S. stipitis* par rapport au contrôle sans LI, peu importe le pourcentage de ce dernier.

Le comportement de la levure *S. stipitis* vis-à-vis de ces LI dérivés d'imidazolium est différent de celui observé pour *S. cerevisiae* et *K. marxianus* (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018). En effet, l'addition du LI (1% d'[Emim][OAc] et 4% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]) au milieu de culture améliore la production d'éthanol, respectivement par rapport au contrôle de +62 et +40% par *S. cerevisiae* qui tolère plus l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] que l'[Emim][OAc] (Mehmood *et al.*, 2015). De même, la présence de faibles concentrations de LI (jusqu'à 2% d'[Emim][OAc] et 6% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]) augmente la production éthanolique par *K. marxianus* jusqu'à +22% pour 1% d'[Emim][OAc] et +34% pour 3% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] par rapport au contrôle sans LI (Mehmood *et al.*, 2018). L'augmentation de la production d'éthanol observée pour *S. cerevisiae* et *K. marxianus* est due à un shift métabolique de la respiration à la fermentation, induit par la présence des LI.

## **6. Toxicité des liquides ioniques sur les levures : détermination de la concentration minimale inhibitrice**

Dans le même objectif de tester l'effet des LI, notamment l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], on a déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur les quatre levures : *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* et *S. stipitis*.

Pour ce faire, les cultures des levures sont réalisées dans des tubes stériles (de 10 mL) sur milieu YM glucose avec ou sans ajout de LI (de 0,5 jusqu'à 10% v/v), le volume réactionnel total étant de 1 mL. Les suspensions cellulaires de levures sont inoculées dans chaque tube à une DO<sub>600nm</sub> de 0,125. Les cultures de levures sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 h sous agitation (pour les quatre levures) et les croissances des levures sont déterminées par mesure de la DO<sub>600nm</sub>.

Les résultats des CMI des quatre levures, exprimés en pourcentage de LI sont regroupés dans le **Tableau III.6**.

**Tableau III.6.** Toxicité des LI sur les quatre souches de levures sélectionnées dans cette étude

Liquide ionique (% v/v)	[Emim][OAc]	[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YSC2 Type II	1 %	5 %
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UMIP 2234.94	3 %	6 %
<i>Scheffersomyces shehatae</i> CLIB 1339	1 %	10 %
<i>Scheffersomyces stipitis</i> CLIB 187	2 %	2 %

A la lumière des résultats présentés dans le **Tableau III.6**, il est remarquable que *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *S. shehatae* présentent des tolérances différentes vis-à-vis des deux LI, alors que *S. stipitis* montre une tolérance similaire vis-à-vis des deux LI. En effet, *K. marxianus* s'est montrée la plus tolérante à l'[Emim][OAc] (CMI de 3%) puis *S. stipitis* (CMI de 2%) et *S. cerevisiae* (CMI de 1%) et *S. shehatae* (CMI de 1%) sont toutes les deux les moins tolérantes à l'[Emim][OAc]. En revanche, les CMI obtenues dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sont supérieures à l'[Emim][OAc] pour les toutes les espèces testées à l'exception de *S. stipitis* où la même valeur de CMI est retrouvée sur les deux LI (2%). Pour les trois autres levures, les CMI respectives de *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *S. shehatae* sur l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sont de 5, 6 et 10%. Ainsi, *S. shehatae* représente l'espèce qui tolère le plus l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] jusqu'à 10%, alors que sa tolérance à l'[Emim][OAc] est la plus faible (CMI de 1%). Par ailleurs, *K. marxianus* tolère un peu mieux les deux LI que *S. cerevisiae* avec toutefois une meilleure tolérance vis-à-vis de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] conformément aux études précédentes (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018).

Ainsi, l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] semble être plus biocompatible et mieux toléré que l'[Emim][OAc] par *S. cerevisiae*, *K. marxianus* et *S. shehatae*. Ceci met en évidence l'effet important qu'exerce l'anion constitutif du LI lors de l'interaction de celui-ci avec les cellules. Cependant, le mécanisme de toxicité des LI sur les levures reste actuellement méconnu, comme décrit dans la littérature (Sitepu *et al.*, 2014 ; Dickinson *et al.*, 2016 ; Cao *et al.*, 2017). Les LI devraient interagir avec les polysaccharides

constitutifs des parois cellulaires des levures de la même manière qu'ils interagissent avec les polysaccharides de la BLC. Comme l'anion du LI peut influencer différemment l'effet de ce dernier sur la déstructuration de la BLC (Fukaya *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2008 ; Zavrel *et al.*, 2009), c'est peut être également vraisemblablement la cas sur la paroi des levures. De plus, les proportions des polysaccharides constitutifs des parois cellulaires présentent des variabilités selon les souches des levures, ce qui pourrait expliquer l'effet différent du LI sur les quatre espèces testées.

Les LI pourraient aussi exercer un effet intracellulaire en modifiant par exemple la structure de la membrane mitochondriale des levures ce qui perturberait les fonctions de respiration liées à la mitochondrie et induirait une inhibition de la croissance. Mehmood *et al.* (2015) et Mehmood *et al.* (2018) ont montré que l'addition d'[Emim][OAc] ou d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] bascule le métabolisme de *S. cerevisiae* et *K. marxianus* également, d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme fermentaire, ce qui est probablement lié à un impact sur la mitochondrie. Par ailleurs, Dickinson *et al.* (2016) ont trouvé que la présence d'[Emim][OAc] induit une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale de *S. cerevisiae* Y133-IIL ce qui provoque par la suite une mort cellulaire. Par conséquent, l'effet du LI dépend de sa nature, de sa concentration et également du microorganisme considéré.

Nos résultats ont montré qu'à des faibles concentrations en LI ne dépassant pas les 10%, les croissances des levures testées sont inhibées. Toutefois, on note que l'[Emim][OAc] (CMI comprises entre 1 et 3%) s'est révélé plus toxique sur les levures que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (CMI comprises entre 2 et 10%).

## 7. Conclusion partielle

En conclusion, les croissances et les rendements maximaux en éthanol (exprimés en g/L ou en pourcentage) enregistrés pour les quatre espèces de levures sélectionnées sur les hexoses et pentoses sont récapitulés ci-dessous.

### 7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Les résultats obtenus avec la souche *S. cerevisiae* sont regroupés dans le **Tableau III.7.**

**Tableau III.7.** Croissances et rendements maximaux en éthanol obtenus avec *S. cerevisiae* à 30°C

Milieu de culture	DO <sub>max600nm</sub>	[EtOH] max (g/L)	Rdt EtOH max (%)
YM	4,0 (± 0,4)	0,0	0,0
YM glucose aérobie	14,5 (± 1,5)	8,9 (± 0,5)	87,2 (± 4,8%)
YM galactose aérobie	15,7 (± 0,2)	7,0 (± 0,1)	68,7 (± 1,1%)
YM mannose aérobie	14,1 (± 0,6)	7,0 (± 0,0)	68,3 (± 0,1%)
YM xylose aérobie	3,8 (± 0,1)	0,0	0,0
YM xylitol aérobie	4,2 (± 0,2)	0,0	0,0
YM D-arabinose aérobie	3,0 (± 0,2)	0,0	0,0
YM glucose anaérobie	8,1 (± 0,1)	10,4 (± 0,0)	99,6 (± 0,4%)
YM galactose anaérobie	8,0 (± 0,4)	8,6 (± 0,1)	84,4 (± 1,0%)
YM mannose anaérobie	7,2 (± 0,5)	9,1 (± 0,1)	89,6 (± 1,0%)

Ainsi, la levure *S. cerevisiae* produit les meilleurs rendements éthanoliques à partir des hexoses, notamment le glucose en conditions anaérobies (Yéthanol = 99%), mais présente l'inconvénient d'être incapable de fermenter les pentoses, ni le xylitol.

## 7.2. *Kluyveromyces marxianus*

Les croissances et les rendements maximaux en éthanol obtenus avec la souche *K. marxianus* sont regroupés dans le **Tableau III.8**.

**Tableau III.8.** Croissances et rendements maximaux en éthanol obtenus avec *K. marxianus* à 35°C

Milieu de culture	DO <sub>max600nm</sub>	[EtOH] max (g/L)	Rdt EtOH max (%)
YM	1,9 (± 0,0)	0,0	0,0
YM glucose aérobie	19,3 (± 0,4)	5,7 (± 0,1)	55,8 (± 0,6%)
YM galactose aérobie	16,5 (± 0,0)	4,9 (± 0,1)	48,1 (± 0,6%)
YM mannose aérobie	20,6 (± 0,7)	4,9 (± 0,2)	47,7 (± 2,4%)
YM xylose aérobie	0,5 (± 0,0)	0,0	0,0
YM xylitol aérobie	0,8 (± 0,1)	0,0	0,0
YM arabinose aérobie	0,9 (± 0,0)	0,0	0,0
YM glucose anaérobie	9,1 (± 0,1)	8,2 (± 0,1)	79,9 (± 0,9%)
YM galactose anaérobie	8,2 (± 0,7)	6,0 (± 0,1)	59,2 (± 0,8%)
YM mannose anaérobie	13,9 (± 0,1)	6,5 (± 0,1)	63,9 (± 1,1%)
YM xylose anaérobie	0,5 (± 0,0)	0,0	0,0
YM D-arabinose anaérobie	0,8 (± 0,0)	0,0	0,0

En outre, la souche de *K. marxianus* utilisée dans notre étude fermente les hexoses avec des rendements inférieurs à ceux produits par *S. cerevisiae*, et ne présente pas la capacité de fermenter les pentoses même en anaérobie.

### 7.3. *Scheffersomyces shehatae*

Les maximums de croissance et de rendements en éthanol mesurés pour la levure *S. shehatae* sont présentés dans le **Tableau III.9**.

**Tableau III.9.** Croissances et rendements maximaux en éthanol obtenus avec *S. shehatae* à 30°C

Milieu de culture	DO <sub>max600nm</sub>	[EtOH] max (g/L)	Rdt EtOH max (%)
YM	7,0 (± 0,2)	0,0	0,0
YM glucose aérobie	23,9 (± 2,2)	4,4 (± 0,1)	42,6 (± 0,5%)
YM galactose aérobie	22,8 (± 1,5)	2,2 (± 0,5)	21,1 (± 5,3%)
YM mannose aérobie	20,4 (± 1,0)	3,1 (± 0,1)	30,4 (± 1,2%)
YM xylose aérobie	18,6 (± 1,6)	3,2 (± 0,1)	31,0 (± 0,8%)
YM xylitol aérobie	12,0 (± 0,2)	0,0	0,0
YM D-arabinose aérobie	16,2 (± 0,1)	0,0	0,0
YM L-arabinose aérobie	20,6 (± 1,1)	0,0	0,0
YM glucose anaérobie	17,0 (± 1,2)	8,2 (± 0,4)	79,8 (± 3,8%)
YM galactose anaérobie	16,3 (± 0,2)	5,9 (± 0,1)	57,8 (± 9,6%)
YM mannose anaérobie	19,2 (± 1,4)	7,9 (± 0,0)	77,2 (± 1,2%)
YM xylose anaérobie	18,2 (± 0,5)	5,8 (± 0,0)	56,5 (± 0,2%)
YM xylitol anaérobie	15,5 (± 0,04)	0,0	0,0
YM D-arabinose anaérobie	15,2 (± 0,3)	0,0	0,0

La levure *S. shehatae* présente un large spectre de substrats pouvant être fermentés en éthanol incluant le D-glucose, le D-galactose, le D-mannose et le D-xylose. De plus, elle s'est montrée capable de consommer l'arabinose et partiellement le xylitol mais sans les fermenter en éthanol.

### 7.4. *Scheffersomyces stipitis*

Les croissances et les rendements éthanoliques maximaux enregistrés dans le cas de la levure *S. stipitis* sont illustrés dans le **Tableau III.10**.

**Tableau III.10.** Croissances et rendements maximaux en éthanol obtenus avec *S. stipitis* à 30°C

Milieu de culture	DO <sub>max600nm</sub>	[EtOH] max (g/L)	Rdt EtOH max (%)
YM	6,8 (± 0,4)	0,0	0,0
YM glucose aérobie	26,4 (± 3,1)	7,6 (± 0,4)	74,4 (± 3,9%)
YM galactose aérobie	23,8 (± 2,5)	4,2 (± 0,7)	40,9 (± 6,7%)
YM mannose aérobie	25,8 (± 1,4)	6,9 (± 0,1)	67,8 (± 1,0%)
YM xylose aérobie	31,6 (± 1,2)	3,6 (± 0,1)	34,9 (± 1,0%)
YM xylitol aérobie	8,3 (± 0,2)	0,0	0,0
YM D-arabinose aérobie	17,6 (± 0,9)	0,0	0,0
YM L-arabinose aérobie	10,0 (± 0,2)	0,0	0,0
YM glucose anaérobie	33,5 (± 0,4)	6,3 (± 0,1)	61,7 (± 0,8%)
YM galactose anaérobie	35,3 (± 0,9)	8,2 (± 0,3)	80,0 (± 2,5%)
YM mannose anaérobie	32,0 (± 0,4)	5,8 (± 0,2)	56,8 (± 1,7%)
YM xylose anaérobie	35,8 (± 0,6)	5,2 (± 0,2)	51,3 (± 1,5%)
YM xylitol anaérobie	9,7 (± 0,1)	0,0	0,0
YM D-arabinose anaérobie	15,1 (± 3,9)	0,0	0,0

Comme pour *S. shehatae*, la levure *S. stipitis* fermente les hexoses et le xylose en éthanol. Par contre, cette levure ne produit pas d'éthanol à partir de l'arabinose même si elle le consommait. Les rendements en éthanol à partir du xylose étaient similaires pour les deux souches *S. shehatae* et *S. stipitis* mais relativement inférieurs à ceux obtenus à partir des hexoses.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que la levure *S. cerevisiae* génère les meilleurs rendements éthanoliques à partir des hexoses mais est incapable de fermenter les pentoses. Cependant, les levures *S. stipitis* et *S. shehatae* fermentent les pentoses, notamment le xylose mais avec des rendements en éthanol relativement inférieurs par rapport aux hexoses. Les levures *S. shehatae* et *S. stipitis* sembleraient donc être des candidates intéressantes pour la fermentation éthanolique des

hydrolysats enzymatiques de BLC formés à la fois d'hexoses et de pentoses (notamment le xylose dans certaines BLC).

Notons aussi que les conditions anaérobies ont conduit à une amélioration de la production d'éthanol à partir des hexoses pour les quatre souches de levures testées, et à partir du xylose par *S. shehatae* et *S. stipitis*. De plus, pour les quatre souches étudiées, le glucose s'est montré comme étant le meilleur substrat éthanologénique.

Quant à l'effet des LI hydrophiles utilisées : l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur les quatre espèces de levures, il est montré que ces dernières présentent de différentes tolérances vis-à-vis de ces deux LI. Elles peuvent tolérer des faibles concentrations en LI, comprises entre 1 et 10% avec toutefois une meilleure tolérance à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] que l'[Emim][OAc].

Ainsi, à l'issue de ces résultats, l'étude est transposée sur des polymères modèles : cellulose (polymère de glucose) et xylane (polymère de xylose) dont les résultats sont présentés dans le chapitre suivant. Cela permettra de tester l'effet du LI résiduel dans la cellulose prétraitée sur les quatre levures et également de comparer leurs rendements éthanologiques sur hydrolysats enzymatiques de la cellulose et du xylane.

# Chapitre IV

*Application à des polymères  
modèles : Etude de la production  
de bioéthanol à partir de  
cellulose prétraînée aux LI et  
xylane*

## 1. Introduction

La BLC est constituée d'environ 70% de polysaccharides : cellulose (homopolymère de glucose) et hémicelluloses (hétéropolymères de structure et composition variables) (Balat *et al.*, 2008 ; Balat, 2011). Bien que les hémicelluloses soient variées, le xylane représente l'hémicellulose majoritaire de certaines sources de BLC (bois de feuillus, résidus agricoles et déchets municipaux) (Collins *et al.*, 2005 ; Gírio *et al.*, 2010 ; Limayem and Ricke, 2012 ; Spyridon *et al.*, 2016 ; Zabed *et al.*, 2016).

Après avoir étudié la fermentation des quatre espèces de levures à partir de monomères d'hexoses et de pentoses, l'étude est appliquée à des polymères modèles constitutifs de la BLC, notamment la cellulose du coton (moyennes fibres) et le xylane de hêtre. Ces substrats, considérés comme modèles d'étude ont été sélectionnés afin de mettre en évidence l'effet du prétraitement aux LI et l'influence des propriétés de chaque polysaccharide seul sur la digestibilité enzymatique et la fermentation éthanolique en s'affranchissant des autres facteurs liés à la BLC, tels que sa structure tridimensionnelle complexe et la présence de lignines et des autres composants minoritaires.

La cellulose moyenne fibre,  $\beta$ -1,4-D-glucane, se caractérise par une taille allant de 50 à 350  $\mu\text{m}$  (Örmeci and Vesilind, 2000 ; Husson *et al.*, 2011). Le xylane de hêtre est un polysaccharide issu de feuillus qui consiste en une chaîne principale de résidus de D-xylose liés entre eux par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4 avec des groupements latéraux d'acide 4-O-méthylglucuronique liés au xylose en position C-2 et des groupements de O-acétyles attachés au xylose en position C-2 ou C-3 (Freixo and de Pinho, 2002).

Comme les levures sont incapables d'utiliser la cellulose et l'hémicellulose en tant que substrat, une hydrolyse est requise pour convertir ces polymères en sucres fermentescibles, ce qui est rapportée dans la littérature (Liu *et al.*, 2016b) et confirmé également par des expériences témoins montrées ci-dessous. La vérification de l'incapacité des levures à fermenter les polymères constitutifs de la BLC non hydrolysés, a été réalisée sur les deux levures *Saccharomyces cerevisiae* (levure modèle de fermentation d'hexoses) et *Scheffersomyces stipitis* (levure modèle de fermentation de pentoses). Les polymères modèles testés sont la cellulose moyennes

fibres (du coton), le xylane (du hêtre) et la lignine (Kraft). Pour ce faire, des cultures de levures sur milieu Yeast-Malt (YM) additionné de cellulose, xylane ou lignine (à 20 g/L) sont effectuées en duplicat en aérobiose à 30°C, pour *S. cerevisiae* (Figure IV.1) et *S. stipitis* (Figure IV.2).

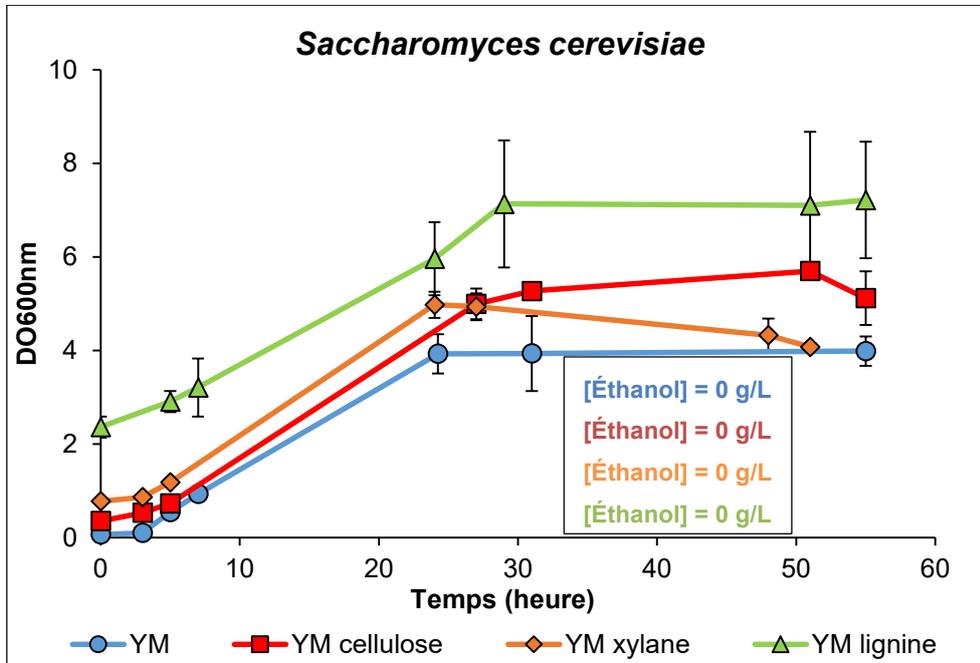


Figure IV.1. Cinétiques de croissance de *S. cerevisiae* sur milieu YM seul ou additionné de cellulose, xylane ou lignine à 30°C en aérobiose

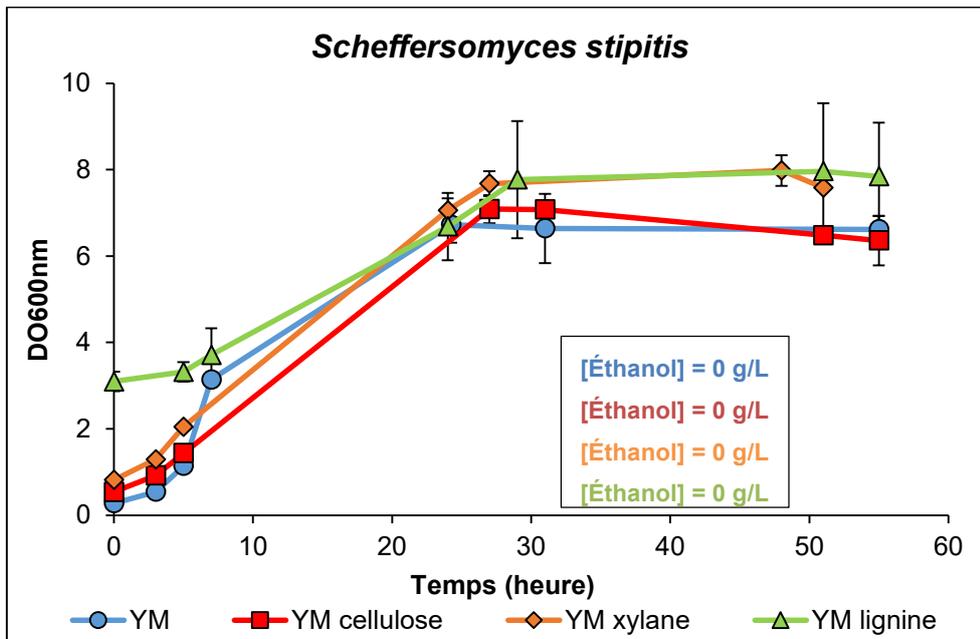


Figure IV.2. Cinétiques de croissance de *S. stipitis* sur milieu YM seul ou additionné de cellulose, xylane ou lignine à 30°C en aérobiose

Comme montré dans les **Figures IV.1 et 2**, la cinétique de croissance de chacune des deux levures testées est proche de celle sur milieu YM seul sans polymère avec des  $DO_{600nm}$  maximales quasiment similaires. Dans le cas de la lignine, les DO sont un peu plus élevées dès le début des cultures ce qui est expliqué par l'opacité du milieu contenant la lignine. Ces observations confirment l'incapacité des levures à dégrader la cellulose, le xylane et la lignine pour se multiplier.

De plus, les analyses réalisées par HPLC n'ont montré aucune production d'éthanol pour toutes les conditions testées pour chacune des deux levures. *S. cerevisiae* et *S. stipitis* ne sont pas donc capables de produire de l'éthanol à partir des polysaccharides non hydrolysés. Ces résultats témoins confirment ce qui est décrit dans la littérature qu'une étape d'hydrolyse est requise afin de libérer les sucres fermentescibles et rendre possible la conversion des polysaccharides : cellulose et xylane, en bioéthanol 2G par les levures.

Dans ce travail, l'hydrolyse de la cellulose et du xylane est effectuée par voie biochimique mettant en œuvre des enzymes. Il s'agit des cellulases de *Trichoderma reesei* (comprenant un mélange d'endoglucanases, d'exoglucanases et de  $\beta$ -glucosidases) et des xylanases de *Trichoderma longibrachiatum* chargées de la dégradation de la cellulose et du xylane, respectivement.

La cellulose présente une structure supramoléculaire ordonnée due à la présence des ponts hydrogène inter- et intra-chaînes, ce qui limite l'accessibilité des cellulases. Une étape de prétraitement est donc préalablement appliquée pour augmenter la digestibilité enzymatique de la cellulose. A cette fin, deux LI hydrophiles dérivés du cation imidazolium ont été sélectionnés pour le prétraitement de la cellulose : le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] classiquement utilisé pour le prétraitement de substrats lignocellulosiques et régulièrement décrit dans la littérature (Zhao *et al.*, 2009 ; Mäki-Arvela *et al.*, 2010 ; Brandt *et al.*, 2013 ; Elgharbawy *et al.*, 2016), et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] plus récemment développé (Fukaya *et al.*, 2008). Ce dernier semble une alternative prometteuse à l'[Emim][OAc] suite aux travaux effectués au sein de notre laboratoire (Husson *et al.*, 2011 ; Auxenfans *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2014a et b ; Auxenfans *et al.*, 2017). D'après l'ensemble de ces travaux, l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] désorganisent efficacement la matrice

lignocellulosique, ce qui se traduit par une nette amélioration des rendements de saccharification enzymatique.

## **2. Mise au point du protocole expérimental**

### **2.1. Température du prétraitement aux LI et hydrolyse enzymatique**

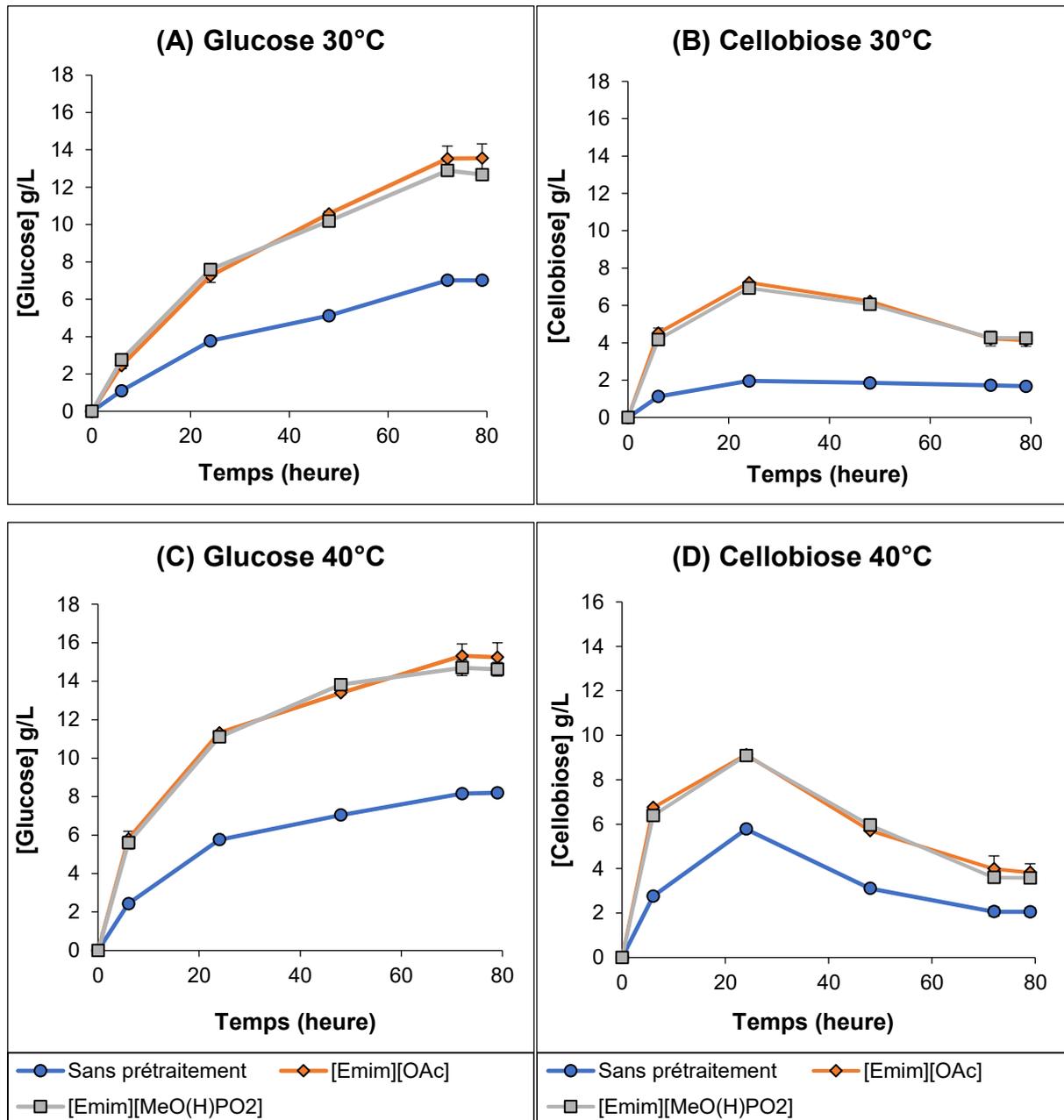
Les prétraitements par les LI sont souvent réalisés à des températures comprises entre 80 et 160°C (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010 ; Badgujar and Bhanage, 2015). De plus, au sein de notre laboratoire, les prétraitements de la cellulose et de la BLC sont classiquement effectués à une température de 110°C.

Or, l'objectif de cette étude étant de valoriser la BLC selon un procédé doux, respectueux de l'environnement et plus favorable énergétiquement, le prétraitement de la cellulose et de la BLC est effectué à 35°C.

En prenant comme base, les études antérieures au sein de notre laboratoire (Husson *et al.*, 2011 ; Auxenfans *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2014a et b), une concentration initiale en substrat (ligno)cellulosique de 2% m/v a été utilisée pour la réalisation des prétraitements aux LI ainsi que pour les hydrolyses enzymatiques présentées dans cette étude (sauf exception de l'hydrolyse simultanée de cellulose et du xylane où une concentration totale en substrat de 4% m/v a été retenue).

Les cellulases de *T. reesei* ont été sélectionnées puisqu'elles sont les plus étudiées dans la littérature et présentent l'origine principale de cellulases commerciales (Eggeman and Elander, 2005). De plus, une concentration finale en cellulases de 1 mg/mL a été conservée en s'appuyant sur les travaux précédemment développés au laboratoire (Husson *et al.*, 2011 ; Auxenfans *et al.*, 2012), pour catalyser l'ensemble des hydrolyses enzymatiques mises en œuvre en tampon acétate (50 mM ; pH 4,8). Concernant la température, l'ensemble des réactions d'hydrolyse enzymatiques de cellulose, catalysées par les cellulases, antérieurement réalisées au laboratoire ont été menées à 40°C. Or, dans notre étude, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose est réalisée à 30°C : température optimale pour la fermentation éthanolique, le but étant de combiner les étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique. De plus, les concentrations en glucose et en cellobiose

obtenues par hydrolyse enzymatique par les cellulases à 30°C sont comparées avec celles à 40°C (Figure IV.3).



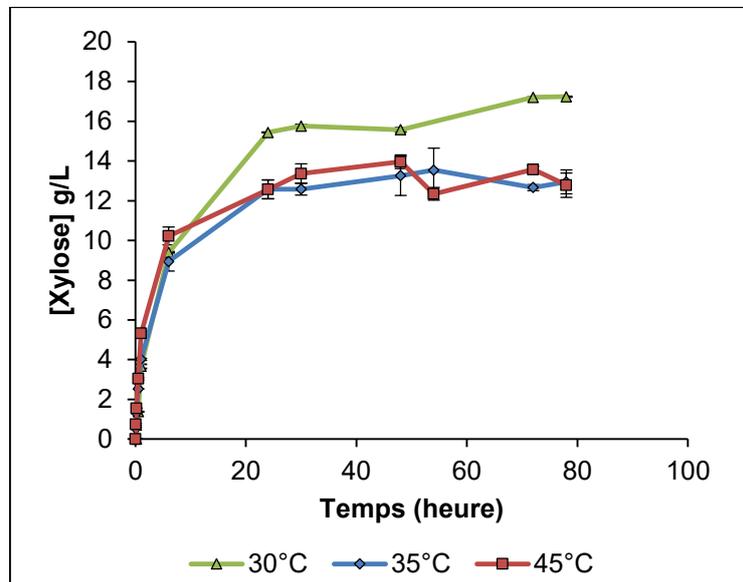
**Figure IV.3.** Cinétiques de production du glucose (à gauche) et du cellobiose (à droite) lors de l'hydrolyse enzymatique catalysée par les cellulases à 30°C (A et B) et 40°C (C et D) de la cellulose non prétraitée et prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (à 35°C pendant 40 min) (barres d'erreur souvent confondues dans les symboles)

Ces résultats ont montré que dans les deux conditions de température testées, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose avec ou sans prétraitement aux LI est caractérisée par une augmentation progressive du glucose dans le milieu jusqu'à 72

h. En absence de prétraitement, la concentration en glucose à 72 h est de 7,0 et 8,2 g/L à 30 et 40°C, respectivement. Après prétraitement de la cellulose à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], les concentrations en glucose atteintes à 30°C après 72 h d'hydrolyse sont de 13,5 et 12,9 g/L. Le prétraitement préalable de la cellulose à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] permet une conversion respective en glucose de 60,8% et 58,0% contre 31,6% pour le contrôle sans prétraitement et améliore donc les rendements en glucose d'un facteur de 1,9 et 1,8, respectivement. Par ailleurs, l'hydrolyse enzymatique à 40°C de la cellulose prétraitée à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], a conduit à des concentrations respectives plus élevées en glucose : 15,3 et 14,7 g/L correspondant à des rendements de 68,9% et 66,2% contre 36,7% (8,2 g/L) pour le contrôle sans prétraitement. Ainsi, une légère augmentation des concentrations finales en glucose d'un facteur de 1,1 a été obtenue à 40°C par rapport à 30°C. Toutefois, les deux LI ont montré un effet quasiment similaire sur les rendements en glucose avec un effet légèrement plus élevé pour l' [Emim][OAc]. Quant au cellobiose, sa concentration augmente progressivement en début d'hydrolyse jusqu'à 24 h, puis elle diminue puisqu'il est hydrolysé en glucose par les  $\beta$ -glucosidases contenues dans le mélange cellulolytique de *T. reesei*. On note une accumulation du cellobiose dans le milieu plus marquée dans le cas de la cellulose prétraitée quel que soit le LI (optimum de 6,9 g/L vers 24 h à 30°C et de 9,1 g/L vers 24 h à 40°C) que pour la cellulose non prétraitée (optimum de 2,0 g/L vers 24 h à 30°C et de 5,8 g/L vers 24 h à 40°C). Ainsi, la réalisation de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les cellulases à 30°C ne montre pas un impact significativement négatif sur les rendements en glucose en comparaison avec ceux obtenus à 40°C.

D'autre part, le xylane, ne possédant pas une structure cristalline contrairement à la cellulose, n'a pas été prétraité aux LI. Pour son hydrolyse, les xylanases de *T. longibrachiatum* ont été sélectionnées parmi les hémicellulases disponibles commercialement en se basant sur l'étude de Yasuda *et al.* (2014). Cependant, pour ces xylanases, les conditions opératoires optimales ont dues être mises au point. Pour cette raison, en partant d'une concentration en xylane de 2% m/v, on a cherché à optimiser quelques paramètres expérimentaux : température, concentration finale en enzymes et milieu réactionnel. En s'appuyant sur les travaux de Yasuda et ses collaborateurs (2014), une concentration finale en xylanases de *T. longibrachiatum* de 3 mg/mL a été choisie pour étudier l'effet de la température sur l'efficacité de

l'hydrolyse enzymatique du xylane. Trois températures ont été sélectionnées : 30, 35 et 45°C puisque ces xylanases sont d'origine mésophile. Dans chaque cas, l'hydrolyse enzymatique du xylane (2% m/v) est réalisée en tampon acétate (50 mM ; pH 4,8). Les cinétiques respectives de libération de xylose sont illustrées en **Figure IV.4**.



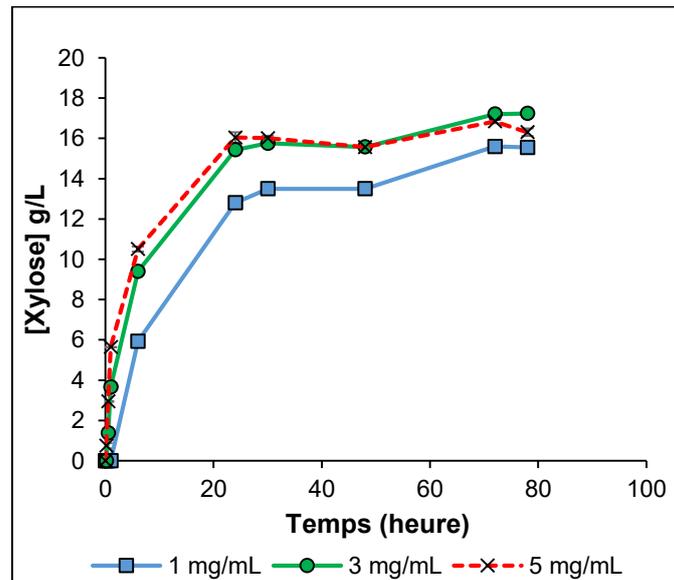
**Figure IV.4.** Cinétiques de production du xylose produit lors de l'hydrolyse du xylane par les xylanases de *T. longibrachiatum* à une concentration finale de 3 mg/mL à 30, 35 ou 45°C

Comme montré dans la **Figure IV.4**, pendant les premières six heures de réaction, le taux d'hydrolyse est similaire pour les trois températures testées. Les concentrations en xylose augmentent entre 0 et 24 h pour toutes les conditions expérimentales. Les concentrations finales en xylose sont quasi identiques et proches de 13 g/L après 72 h d'hydrolyse à 35 ou 45°C. En revanche, une amélioration de la conversion du xylane en xylose est notée à 30°C aboutissant à une concentration maximale en xylose de 17,2 g/L après 72 h. Ainsi, suite aux résultats de ces études préliminaires, une température de 30°C a été fixée pour l'ensemble des réactions d'hydrolyse enzymatique de la cellulose et du xylane.

La température de 30°C semble être un bon compromis entre les conditions optimales des enzymes cellulases et xylanases impliquées dans l'étape de l'hydrolyse des polysaccharides et les levures responsables de la fermentation éthanolique des hydrolysats enzymatiques de la cellulose, du xylane ou de la BLC. Par conséquent, toutes les cultures de levures sur les hydrolysats enzymatiques de la cellulose, du xylane et de leur mélange sont par la suite réalisées à 30°C que ce soit en procédé

séquentiel, *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF), soit en les combinant selon un procédé simultané, *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF).

Ensuite, une autre étude préliminaire a été réalisée afin de déterminer la meilleure concentration de xylanases à utiliser dans la suite de l'étude. Trois concentrations finales en xylanases ont ainsi été étudiées : 1 mg/mL, 3 mg/mL et 5 mg/mL, en fixant la température à 30°C avec une concentration en xylane de 2% m/v en tampon acétate (50 mM ; pH 4,8). Les cinétiques respectives de production de xylose sont montrées dans la **Figure IV.5**.

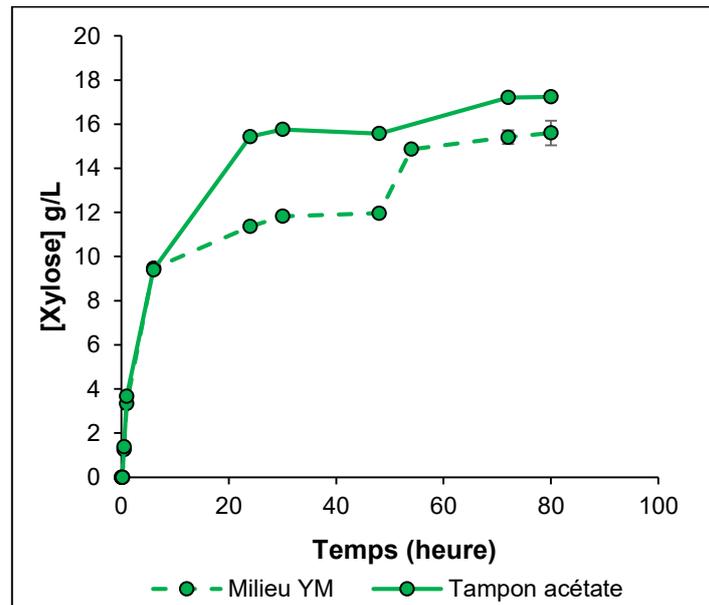


**Figure IV.5.** Cinétiques de production de xylose lors de l'hydrolyse du xylane par les xylanases de *T. longibrachiatum* à une concentration finale de 1 mg/mL, 3 mg/mL ou 5 mg/mL en tampon acétate à 30°C

Pour les 3 conditions étudiées, une augmentation du xylose libéré apparaît dès les premières heures de l'hydrolyse jusqu'à 24 h environ, puis un plateau arrive jusqu'à 78 h, avec une allure de courbe similaire pour les 3 concentrations en enzymes testées. Toutefois, l'augmentation de la teneur en enzymes a conduit à une amélioration de la vitesse de production du xylose et de la concentration maximale en xylose comme illustré dans la **Figure IV.5**. En effet, pour une concentration en xylanases de 1 mg/mL, la quantité maximale du xylose libéré est de 15,6 g/L ce qui correspond à un rendement de 68,6% à 72 h. Lorsque la teneur en enzymes augmente jusqu'à 3 mg/mL ou 5 mg/mL, les concentrations en xylose sont plus élevées : 17,2 g/L à 78 h pour une teneur de 3 mg/mL et 16,8 g/L pour celle de 5 mg/mL, soit 75,7% et 74,1%, respectivement.

Ainsi, une concentration en xylanases de 3 mg/mL a été retenue pour la suite de l'étude puisqu'elle génère les meilleurs rendements en xylose.

De plus, en vue de réaliser le procédé simultané SSF, on a cherché à étudier l'hydrolyse enzymatique du xylane en milieu YM (Yeast - Malt), milieu de culture adapté aux levures. Pour ce faire, toutes les conditions déjà fixées ont été gardées sauf que le milieu réactionnel est maintenant le milieu YM (pH 4,8) au lieu du tampon acétate (50 mM ; pH 4,8). Les cinétiques d'hydrolyse enzymatique du xylane en milieu YM ou en tampon acétate à 30°C sont présentées dans la **Figure IV.6**.



**Figure IV.6.** Cinétiques du xylose produit lors de l'hydrolyse du xylane par les xylanases de *T. longibrachiatum* à une concentration finale de 3 mg/mL en milieu YM ou en tampon acétate à 30°C

Au début de l'hydrolyse enzymatique (de 0 à 6 h), le taux d'hydrolyse du xylose est similaire pour les deux conditions : milieu YM et tampon acétate. Après les six premières heures d'hydrolyse enzymatique, l'augmentation en xylose était plus forte en tampon acétate qu'en milieu YM qui semblerait moins approprié pour les xylanases. Un plateau est atteint après 24 h environ en tampon acétate mais on arrive à un plateau après 54 h environ en milieu YM. La concentration maximale en xylose produit en milieu YM est de 15,6 g/L représentant un rendement de 68,6% contre 75,7% dans le tampon acétate. Le remplacement du tampon acétate par le milieu YM fait diminuer les rendements d'hydrolyse du xylane par les xylanases. Ainsi, on a gardé pour la suite l'hydrolyse enzymatique en tampon acétate, tout en ajoutant du milieu YM concentré

afin d'obtenir les concentrations adéquates en composants du milieu YM pour l'étape de fermentation.

Enfin, le **Tableau IV.1** récapitule les principales conditions expérimentales choisies dans ce chapitre et appliquées pour la cellulose et le xylane.

**Tableau IV.1.** Les principales conditions expérimentales effectuées dans cette étude pour les trois étapes du procédé de bioconversion de la cellulose et du xylane

Conditions expérimentales	Cellulose modèle	Xylane modèle
<b>Prétraitement aux LI</b>	-Température : 35°C -Durée : 40 min -Charge cellulose/LI : 2% m/v	Pas de prétraitement
<b>Hydrolyse enzymatique</b>	-Température : 30°C -Milieu réactionnel : Tampon acétate (50 mM, pH 4,8) -Enzymes : cellulases de <i>T. reesei</i> -Concentration finale en cellulose : 2% m/v -Concentration finale en cellulases : 1 mg/mL	-Température : 30°C -Milieu réactionnel : Tampon acétate (50 mM, pH 4,8) -Enzymes : xylanases de <i>T. longibrachiatum</i> -Concentration finale en xylane : 2% m/v -Concentration finale en xylanases : 3 mg/mL
<b>Fermentation éthanolique</b>	-Température 30°C -Milieu : Tampon acétate additionné de milieu YM concentré -Espèces de levures : <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>S. shehatae</i> et <i>S. stipitis</i>	-Température 30°C -Milieu : Tampon acétate additionné de milieu YM concentré -Espèces de levures : <i>S. shehatae</i> et <i>S. stipitis</i> (espèces fermentant le xylose)

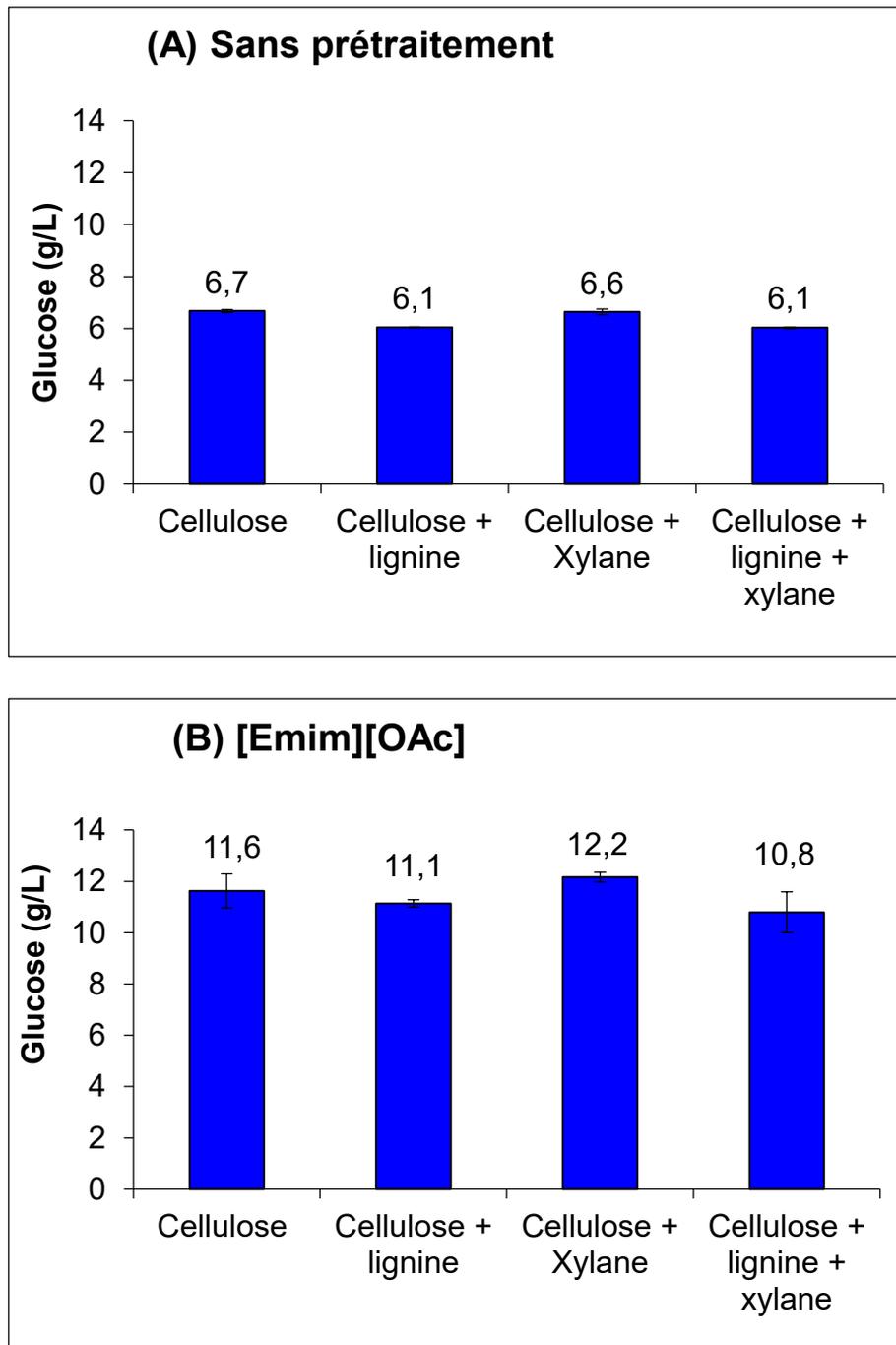
Pour la conversion de la cellulose et du xylane en bioéthanol, deux options sont testées, soit en séparant l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique selon un procédé séquentiel SHF, soit en les combinant selon un procédé simultané SSF.

## 2.2. Effet du xylane et/ou de la lignine sur l'hydrolyse de la cellulose par les cellulases

Dans la BLC, la lignine et/ou l'hémicellulose pourraient entraver les cellulases physiquement ou même chimiquement (inhibition), empêchant ainsi l'attaque de la cellulose par les cellulases (Liao *et al.*, 2005 ; Pan *et al.*, 2005). Afin d'évaluer l'effet de la présence du xylane et/ou de la lignine sur l'hydrolyse de la cellulose catalysée par les cellulases de *T. reesei*, une quantité déterminée de xylane et/ou de lignine Kraft a été ajoutée dans le milieu réactionnel.

En prenant la sciure de chêne comme exemple de référence (44,7% ( $\pm$  0,3) de cellulose ; 14,8% ( $\pm$  1,8) de xylose et 26,7 ( $\pm$  0,8) de lignine) puisque cette BLC a été antérieurement étudiée au sein de notre laboratoire (Auxenfans *et al.*, 2014b), sa composition a été donc mimée. Pour ce faire, des quantités de 0,2 g de cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc], 0,1 g de lignine Kraft et 0,05 g de xylane ont été fixées. La cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] n'a pas été testée, faute de temps.

L'hydrolyse de la cellulose prétraitée ou non a été réalisée comme précédemment en tampon acétate (50 mM ; pH 4,8) à 30°C. Les concentrations finales en cellulose et en cellulases sont de 20 g/L et 1 g/L, respectivement avec ajout ou non du xylane et/ou de lignine selon les quantités déterminées plus haut. Les concentrations maximales en glucose obtenus après 72 h d'hydrolyse enzymatique par les cellulases de *T. reesei* sont illustrés dans la Figure **IV.7** de la cellulose non prétraitée **(A)** et prétraitée à l'[Emim][OAc] **(B)**.



**Figure IV.7.** Concentrations maximales en glucose obtenus après 72 h d'hydrolyse enzymatique de la cellulose non prétraitée (A) ou prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) par les cellulases de *T. reesei* à 30°C avec ajout ou non de xylane et/ou de lignine

Comme montré dans la **Figure IV.7 A**, les concentrations maximales en glucose obtenues à partir de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose non prétraitée sont proches se situant entre 6,1 et 6,7 g/L que ce soit en absence ou en présence du xylane et/ou de lignine. Par ailleurs, le prétraitement préalable de la cellulose à l'[Emim][OAc] a conduit à une concentration maximale en glucose de 11,6 g/L (**Figure**

**IV.7 B**) contre 6,7 g/L pour la cellulose non prétraitée (**Figure IV.7 A**). Ceci confirme que la structure cristalline et ordonnée de la cellulose peut entraver l'accessibilité des cellulases et par suite diminuer les rendements d'hydrolyse. D'où le rôle du prétraitement de la cellulose par le LI à altérer la surface supramoléculaire de la cellulose en augmentant les régions amorphes rendant l'accès des enzymes au substrat plus facile. Ceci se traduit par une amélioration de la conversion de la cellulose en glucose observée dans la **Figure IV.7 B**.

En outre, il est à indiquer que la présence du xylane et/ou lignine n'a pas affecté l'activité des cellulases vu que les concentrations maximales en glucose sont quasiment similaires à celles de la cellulose seule. Par conséquent, il peut être constaté que l'ajout de lignine ou de xylane dans le milieu réactionnel ne modifie pas l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par adsorption non spécifique.

Néanmoins, Mansfield *et al.* (1999) ont rapporté que la lignine dans la matrice lignocellulosique s'adsorbe irréversiblement aux cellulases empêchant leur action hydrolytique sur la cellulose. Dans le même contexte, Pan *et al.* (2005) ont suggéré que la lignine au sein de la BLC réduit l'hydrolyse enzymatique de la cellulose selon deux mécanismes distincts : en formant une barrière physique qui limite ou entrave l'accès des cellulases à la cellulose et en se liant à celle-ci. Or, nos résultats ne montrent pas de diminution des rendements en glucose car il s'agit d'un simple ajout de lignine et/ou du xylane et pas d'une matrice lignocellulosique originelle.

Par ailleurs, Mussatto *et al.* (2008) ont abordé l'effet de l'hémicellulose et la lignine sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose au sein d'un substrat lignocellulosique réel : les graines de bières épuisées ou ce qui est aussi connu par les drêches d'orge (BSG : brewer's spent grain). L'hydrolyse enzymatique par des cellulases commerciales de *T. reesei* (celluclast 1,5 L) a été étudiée sur trois formes de BSG : native (non prétraitée), prétraitée par acide dilué (enrichie en lignine et en cellulose) et prétraitée séquentiellement par acide dilué et base diluée (enrichie en cellulose). Mussato et ses collaborateurs (2008) ont trouvé que l'élimination de l'hémicellulose a favorisé l'attaque enzymatique de la cellulose malgré un contenu élevé en lignine en augmentant le rendement d'hydrolyse d'un facteur de 3,5 par rapport à la forme native non prétraitée. De plus, en éliminant l'hémicellulose et la lignine, la conversion de la cellulose en glucose a été encore plus améliorée (d'un facteur de 4,0). Par conséquent, Mussato *et al.* (2008) ont conclu que l'hémicellulose

et la lignine limitent toutes les deux la conversion de la cellulose en glucose catalysée par les cellulases.

D'autre part, les travaux de Deshpande and Eriksson (1984) ont montré que les cellulases de *T. reesei* n'ont pas été inactivées par la présence de lignine mais que 40% des enzymes étaient liées à la lignine après hydrolyse complète de la paille de blé.

Dans nos conditions, on a seulement évalué l'effet de la présence de polymères modèles : xylane et/ou lignine dans le milieu réactionnel sans considérer la complexité de la matrice de la BLC réelle où la structure est largement plus complexe et les interactions entre la cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont complètement différentes dues à l'enchevêtrement de ces trois biopolymères l'un à l'autre.

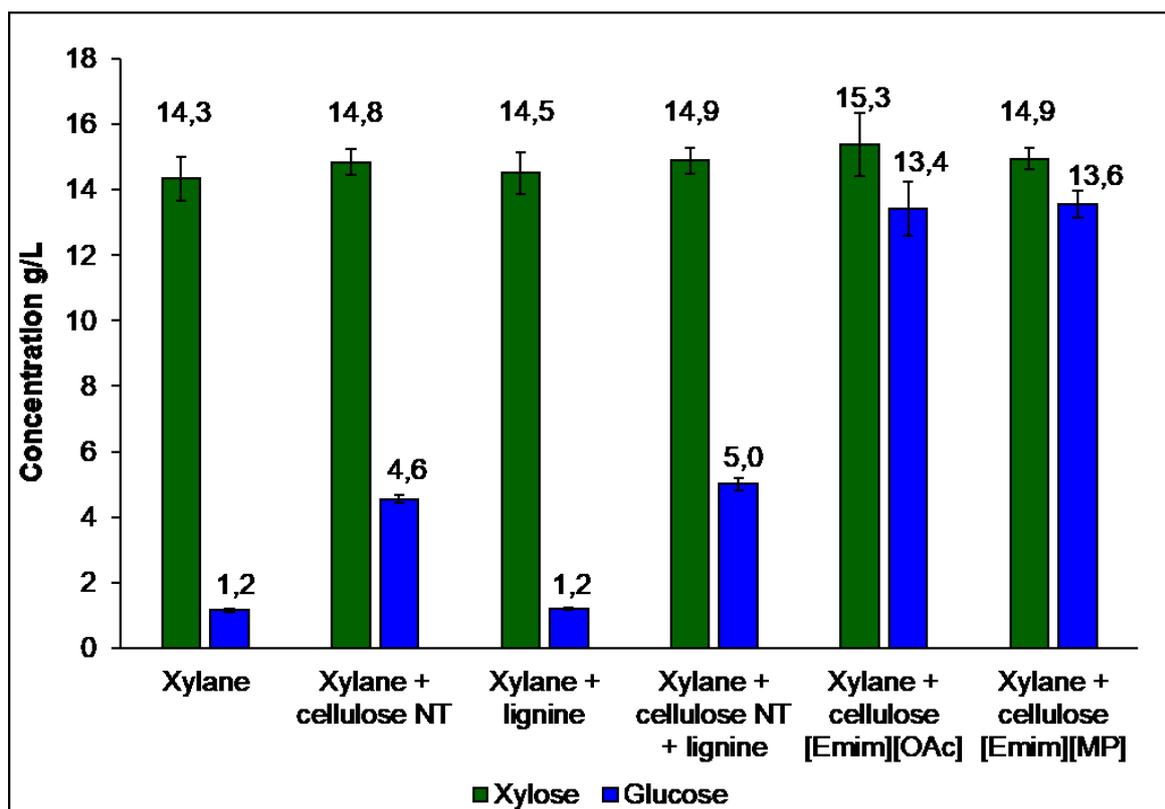
D'ailleurs, l'étude de l'hydrolyse enzymatique sur deux BLC réelles : saule blanc et son de blé, sera abordée dans le chapitre V suivant.

### **2.3. Effet de la cellulose et/ou de la lignine sur l'hydrolyse du xylane par les xylanases**

Du fait que les polysaccharides, la cellulose et l'hémicellulose sont associés à la lignine au sein de la matrice lignocellulosique, il serait intéressant de déterminer l'effet de la lignine sur l'activité des enzymes impliquées dans l'hydrolyse de ces polysaccharides. Pour cette raison, l'effet de la présence de la cellulose ainsi que la lignine sur l'hydrolyse du xylane par les xylanases de *T. longibrachiatum* a été étudié.

L'hydrolyse du xylane par les xylanases avec une concentration de 3 g/L a été effectuée à 30°C en tampon acétate (50 mM ; pH 4,8) pour une concentration en xylane de 20 g/L. Dans certaines conditions, le xylane est accompagné par la présence de la cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] et/ou de la lignine kraft. L'évaluation de la présence de la cellulose non prétraitée et prétraitée aux LI était réalisée afin d'évaluer l'effet du LI résiduel sur l'activité des xylanases.

Dans la **Figure IV.8** sont représentées les concentrations maximales en xylose et en glucose obtenus après 72 h d'hydrolyse enzymatique du xylane par les xylanases de *T. longibrachiatum*.



**Figure IV.8.** Concentrations maximales en xylose et en glucose obtenus après 72 h d'hydrolyse enzymatique du xylane par les xylanases de *T. longibrachiatum* à 30°C en présence ou non de la cellulose et/ou lignine

Tout d'abord, en ce qui concerne l'hydrolyse du xylane, on note une concentration maximale en xylose qui se situe entre 14,3 et 15,3 g/L quelle que soit la condition. Par conséquent, la présence de la cellulose ou de la lignine ne limite pas la conversion du xylane puisque les concentrations maximales en xylose n'ont pas diminué en présence de cellulose et/ou lignine. En plus, ces résultats ont montré qu'en présence de la cellulose prétraitée aux LI, les rendements en xylose n'ont pas non plus diminué. Il semble donc que le LI résiduel que ce soit l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] qui reste piégé dans la cellulose n'affecte pas l'hydrolyse du xylane catalysée par les xylanases.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Kaya *et al.* (2000) qui ont étudié l'influence de la lignine, de ses dérivés et de la liqueur noire issue du procédé Kraft de mise en pâte sur l'hydrolyse du xylane par les xylanases. Ils ont ainsi trouvé que l'addition de la lignine, de ses dérivés ou même de la liqueur noire avait un effet

favorable sur l'hydrolyse enzymatique du xylane en augmentant les rendements ou le taux d'hydrolyse.

Cependant, Senior *et al.* (1990) ont remarqué en évaluant l'activité des xylanases de *Trichoderma harzianum* sur divers substrats, que les substrats à plus forte teneur en lignine ont entraîné la plus grande perte d'activité, mais que la nature de la lignine a également eu un effet. Sutcliffe and Saddler (1986) ont également indiqué que les enzymes provenant de différentes souches de champignons peuvent être liés différemment à divers types de lignine.

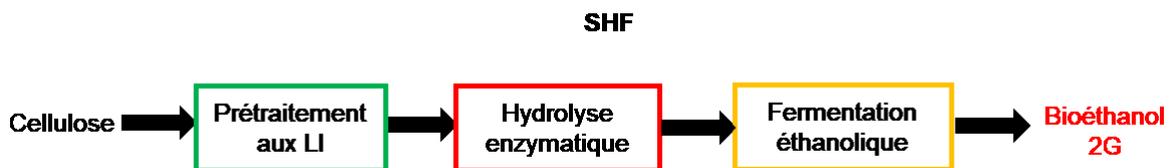
Par ailleurs, l'apparition d'une faible concentration du glucose (1,1 g/L) dans le cas de l'hydrolyse enzymatique du xylane seul ou en présence de la lignine pourrait être expliquée par une légère contamination du xylane par du glucose (à partir de 20 g/L du xylane, la concentration du glucose dosée est de 1,2 g/L).

A côté de cela, il est important de préciser que lorsque la cellulose a été ajoutée dans le milieu réactionnel d'hydrolyse enzymatique du xylane, une production de glucose a été détectée en absence de cellulases. Dans le cas de la cellulose non prétraitée, une concentration en glucose de 4,5 g/L a été enregistrée. Mais l'ajout de la cellulose prétraitée aux LI a entraîné une concentration en glucose significativement plus importante de 13,4 g/L pour la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] et 13,6 g/L pour celle prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ces observations permettent de constater que les xylanases commerciales de *T. longibrachiatum* employées dans cette étude sont contaminées par d'autres activités enzymatiques, notamment une activité cellulase.

### 3. Bioconversion de la cellulose après prétraitement aux liquides ioniques

#### 3.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF

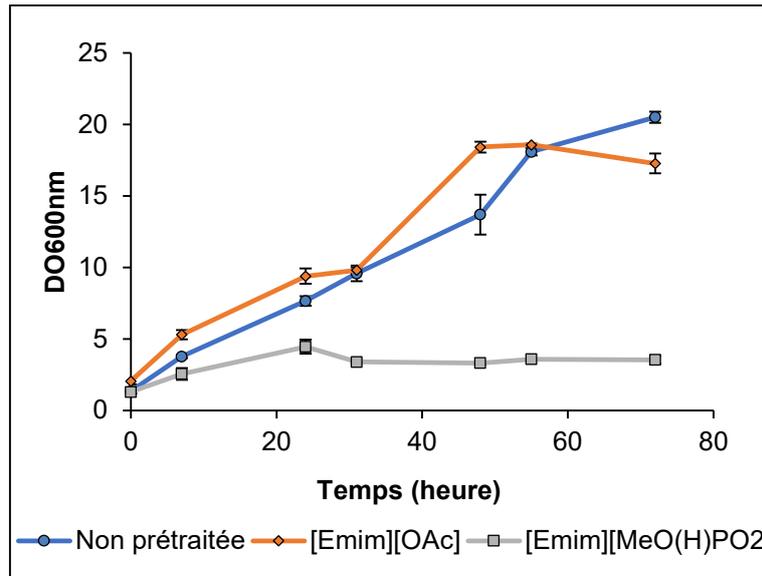
Après 72 h d'hydrolyse enzymatique de la cellulose, les milieux réactionnels sont passés en autoclave afin de stériliser les hydrolysats enzymatiques avant l'étape de fermentation. Le glucose libéré suite à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (à 20 g/L) est fermenté par les levures en présence du LI résiduel présent dans la cellulose prétraitée depuis l'étape de prétraitement (**Figure IV.9**) et dont le pourcentage est estimé entre 0,1 et 10% (Husson *et al.*, 2011) selon le substrat prétraité, le LI et les conditions de prétraitement. Les quatre souches de levures : *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* et *S. stipitis* sont testées pour l'étape de fermentation. Chaque condition a été répétée deux fois et la valeur moyenne est représentée avec les écarts types (souvent invisibles car ils sont confondus dans les symboles).



**Figure IV.9.** Schéma représentant le procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique de la cellulose, SHF

##### 3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La croissance de *S. cerevisiae* sur les hydrolysats enzymatiques de la cellulose non prétraitée ou prétraitée aux LI est représentée dans la **Figure IV.10**.



**Figure IV.10.** Cinétiques de croissance de *S. cerevisiae* durant la SHF de la cellulose non prétraitée ou prétraitée aux LI à 30°C

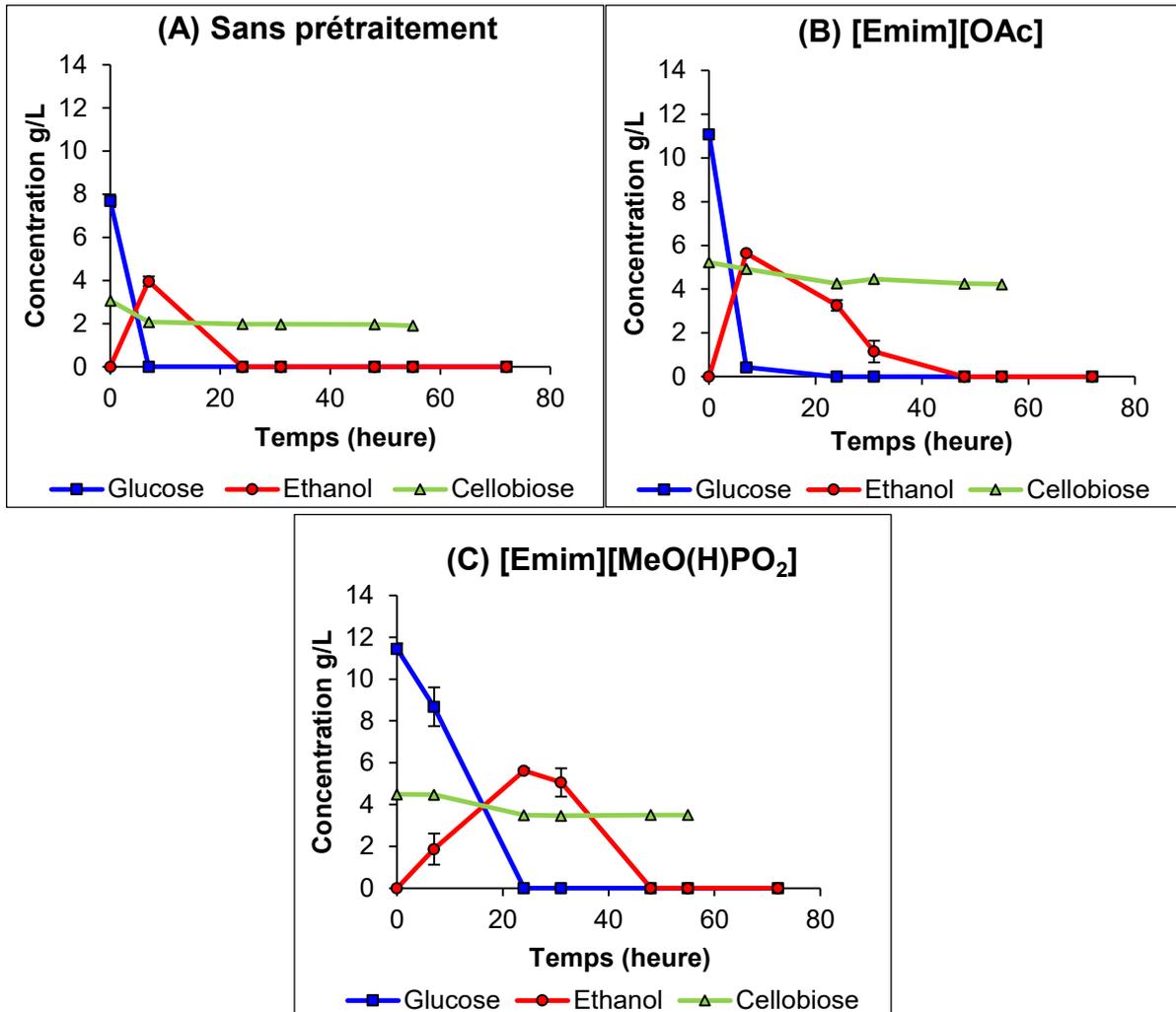
En absence de prétraitement, la levure modèle de fermentation éthanolique, *S. cerevisiae*, se développe bien sur ce milieu où la DO maximale est de 20,5 à 72 h, supérieure à celle obtenue sur YM glucose (DO maximale de 14,5).

Dans le cas du prétraitement de la cellulose, les résultats de croissance de *S. cerevisiae* dépendent du LI utilisé et présentent une grande différence entre l' [Emim][OAc] et l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. En effet, sur la cellulose prétraitée à l' [Emim][OAc], *S. cerevisiae* atteint un maximum de DO de 18,6 à 55 h. La croissance de *S. cerevisiae* sur la cellulose prétraitée à l' [Emim][OAc] présente une allure similaire à celle observée pour le contrôle sans prétraitement comme si le LI résiduel avait peu d'effet sur la croissance des levures.

Cependant, dans le cas du prétraitement à l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], *S. cerevisiae* montre une croissance faible où la DO maximale est de 4,5 à 24 h, nettement inférieure à celle observée dans le cas de l' [Emim][OAc]. Pour les deux LI utilisés il s'agit du même cation imidazolim mais c'est l'anion constitutif du LI qui change et qui semble influencer la croissance de la levure différemment. La faible croissance de *S. cerevisiae* observée dans le cas de la cellulose prétraitée à l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] pourrait être expliquée par la présence du liquide ionique résiduel qui serait ainsi plus importante dans le cas de l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] que l' [Emim][OAc]. Cependant, une étude faite par Mehmood *et al.* (2015) sur la croissance de *S. cerevisiae* sur glucose en présence de ces deux LI a montré que l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] était mieux toléré

(jusqu'à 6% (v/v)) par *S. cerevisiae* que l'[Emim][OAc] (1% (v/v)). Cependant, il est à noter que la présence du LI que ce soit l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ou l'[Emim][OAc] dans le milieu YM glucose diminue la croissance de *S. cerevisiae* (Mehmood *et al.*, 2015). Ces observations peuvent donc suggérer que c'est la quantité du LI résiduel dans la cellulose qui est probablement plus importante dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] et qui affecte ainsi négativement la croissance de la levure *S. cerevisiae* dans notre cas. Ces résultats permettent de suggérer que l'anion méthylphosphonate (MeO(H)PO<sub>2</sub>) fait des interactions plus fortes avec la cellulose que l'acétate (OAc) et que les liaisons hydrogènes établies entre l'anion et la cellulose sont plus fortes avec le (MeO(H)PO<sub>2</sub>) qu'avec l'acétate. Ceci conduirait à ce que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] reste piégé davantage dans la cellulose que l'[Emim][OAc] même après lavage à l'eau. Au vue de la littérature, l'anion constitutif du LI exerce un effet prépondérant sur le nombre et la force des liaisons hydrogènes avec la cellulose ainsi que sur l'énergie d'interaction entre l'anion et la cellulose qui est beaucoup plus importante que celle entre le cation et la cellulose (Fukaya *et al.*, 2008 ; Mora-Pale *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2012 ; Hassan *et al.*, 2015). Ainsi, l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] qui semblerait être présent en teneur résiduelle plus élevée que l'[Emim][OAc] pourrait déstructurer la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* (composée de polysaccharides) de la même manière qu'il désorganise la structure de la cellulose et entraîner une perturbation de la paroi et une inhibition de la croissance.

Les concentrations en sucre (glucose et cellobiose) et en éthanol ont été suivies au cours du temps et présentées en **Figure IV.11**.



**Figure IV.11.** Cinétiques du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SHF de la cellulose non prétraitée (A) ou prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. cerevisiae* à 30°C

Au départ, pour la cellulose non prétraitée, la concentration en glucose est de 7,7 g/L et celle du cellobiose de 3,1 g/L. Au bout de 7 h, tout le glucose est consommé par la levure tandis que la concentration en cellobiose demeure constante. Ce qui confirme nos résultats présentés dans le chapitre précédent que *S. cerevisiae* ne consomme pas le cellobiose.

L'éthanol est produit par les levures simultanément à la consommation du glucose et sa concentration est maximale au moment où la concentration en glucose devient nulle : 3,9 g/L à 7 h ce qui correspond à un rendement éthanolique de 35%. Au-delà de 7 h, la concentration d'éthanol diminue dans le milieu de culture pour devenir nulle après 24 h. Cette diminution de la concentration d'éthanol est due à sa consommation par les levures après l'épuisement du sucre (Mehmood *et al.*, 2015).

Lorsque le prétraitement aux LI est appliqué à la cellulose avant l'hydrolyse enzymatique, les concentrations en glucose au départ sont plus élevées, 11,1 g/L pour l'[Emim][OAc] et 11,4 g/L pour l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] contre 7,7 g/L pour le contrôle.

En 7 h, le glucose est totalement consommé dans le cas de l'[Emim][OAc] et le maximum d'éthanol de 5,6 g/L est atteint avec un rendement de 49,8%. Dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], la consommation du glucose est plus lente. En effet, l'épuisement du glucose coïncide avec l'observation de la concentration maximale d'éthanol soit 5,6 g/L (49,5%) à 24 h. Notons que la même quantité d'éthanol a été produite à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] malgré une croissance plus faible observée pour *S. cerevisiae* sur ce milieu. La présence de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel a seulement affecté la croissance de *S. cerevisiae* mais a amélioré la fermentation éthanolique comme pour l'[Emim][OAc]. Cette observation est en accord avec l'étude de Mehmood *et al.* (2015) qui ont montré que la présence d'[Emim][OAc] ou d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] dans le milieu YM glucose améliore la production d'éthanol par *S. cerevisiae* malgré l'inhibition de la croissance. Par conséquent, la production d'éthanol est plus importante lorsque la cellulose est prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], soit un rendement maximal en éthanol de 49,8 et 49,5% contre 34,9% pour le contrôle sans prétraitement. Les rendements mentionnés ci-dessus sont calculés en fonction de la concentration initiale de cellulose (20 g/L). Mais si les rendements en éthanol sont calculés en tenant compte de la concentration du glucose initialement présent dans les hydrolysats enzymatiques de la cellulose, ces rendements augmentent jusqu'à 79,4%, 98,7% et 96,1% pour la cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement.

Par conséquent, en mettant à part la différence de concentration initiale en glucose entre la cellulose prétraitée et non prétraitée (due à l'effet qu'exerce le prétraitement aux LI sur la cellulose) et en tenant compte du rendement maximal de conversion du glucose en éthanol, on note que ce rendement est meilleur dans le cas de la cellulose prétraitée. Ceci permet de constater que la présence du LI résiduel dans le milieu de culture n'a pas baissé la performance de la fermentation éthanolique par la levure mais elle l'a améliorée, conformément aux travaux de Mehmood *et al.* (2015).

Ces résultats soulignent l'effet qu'exercent les LI sur la modification de la structure supramoléculaire de la cellulose et l'augmentation de l'accessibilité des cellulases qui se traduisent par l'amélioration des rendements en glucose comme déjà décrit dans la littérature (Husson *et al.*, 2011 ; Auxenfans *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2014b). La solvataion de la cellulose dans les LI, principalement à travers la formation de liaisons hydrogènes LI-cellulose, perturbe les liaisons hydrogènes inter- et intra-chaînes de la cellulose libérant ainsi plus d'espace aux cellulases pour y accéder (Swatloski *et al.*, 2002 ; Kosan *et al.*, 2008). Les meilleures concentrations en glucose observées dans le cas de la cellulose prétraitée aux LI sont dues à l'effet du prétraitement sur la modification de la structure de la cellulose conduisant à une meilleure accessibilité des cellulases (Husson *et al.*, 2011 ; Auxenfans *et al.*, 2012).

Il est décrit que la structure tridimensionnelle (3D) des protéines dont les enzymes, est stabilisée par des interactions ioniques et hydrophobes et des liaisons hydrogène (Noritomi *et al.*, 2011). Ainsi, une perturbation de ces interactions stabilisantes peut entraîner la dénaturation et la désactivation des enzymes à travers leur dépliement (Noritomi *et al.*, 2011). Les LI, principalement leurs anions constitutifs, sont capables d'interagir avec les enzymes via des liaisons hydrogène (comme dans le cas de leurs interactions avec la cellulose) causant des changements de conformations de l'enzyme et influençant ainsi la structure 3D, l'activité, l'énantiosélectivité et la stabilité de cette dernière (Naushad *et al.*, 2012).

En outre, il est démontré que plus l'anion est un bon accepteur de protons  $H^+$  et sa nucléophilie est forte, plus son impact négatif sur l'activité et la stabilité des enzymes serait important (Persson and Bornscheuer, 2003 ; Hernández-Fernández *et al.*, 2009 ; Gao *et al.*, 2015). L'effet du LI sur les enzymes dépend donc intimement de l'anion constitutif. Comme par exemple l'étude réalisée par Noritomi *et al.* (2011) sur la stabilité et l'activité du lysozyme dans le 1-éthyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate [Emim][BF<sub>4</sub>], le 1-éthyl-3-méthylimidazolium di (trifluorométhane sulfonate) amide [Emim][Tf<sub>2</sub>N] et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium chlorure [Emim][Cl]. Dans cette étude, il s'agit du même cation mais d'anions différents, l'enzyme a montré une activité et une stabilité plus faibles dans le cas de l'[Emim][Cl]. Le comportement de l'enzyme vis-à-vis de l'[Emim][Cl] est expliqué par le fait que l'anion Cl<sup>-</sup> est l'accepteur de proton le plus fort entre les anions testés pouvant ainsi interagir avec

les protons des groupements hydroxyles de l'enzyme et perturber sa structure tridimensionnelle (Noritomi *et al.*, 2011).

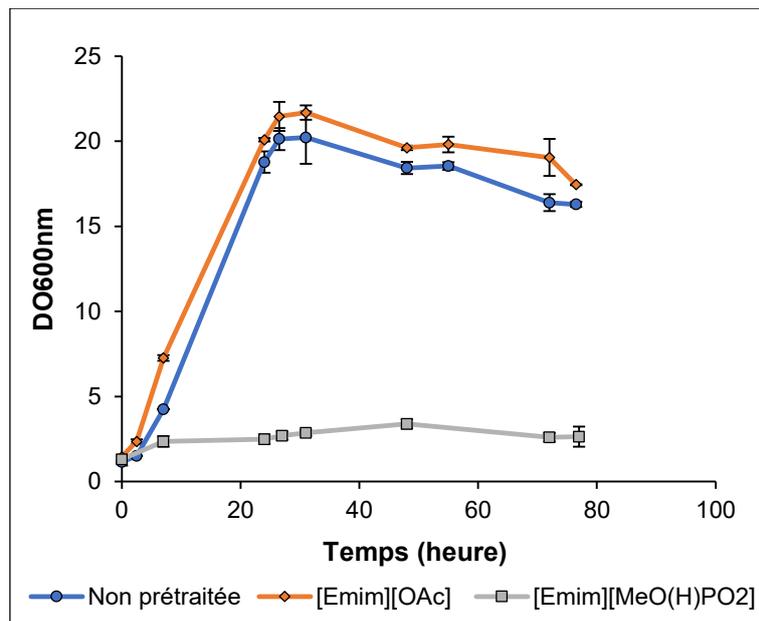
Par ailleurs, Auxenfans *et al.* (2012) et Auxenfans *et al.* (2017) ont étudié la compatibilité entre les cellulases de *T. reesei* et les deux LI : l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] et ont montré que l'effet du LI sur l'activité des cellulases dépend de la concentration du LI et de son anion constitutif. Ils ont constaté une amélioration des rendements en glucose à partir de la cellulose longues fibres pour des concentrations en [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] comprises entre 10 et 40% (v/v) avec un maximum d'activité enzymatique à 10% (rendement en glucose de 68% contre 25% pour le contrôle sans LI). L'amélioration des rendements d'hydrolyse est due à un compromis entre l'effet bénéfique du prétraitement aux LI sur la perturbation des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires de la cellulose et une dénaturation réduite des cellulases (Auxenfans *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2017). En revanche, pour des concentrations en [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] supérieures à 40% (v/v), le LI exerce un effet drastique sur l'activité hydrolytique des cellulases (rendement en glucose de 5%). Auxenfans *et al.* (2012) et Auxenfans *et al.* (2017) ont suggéré que pour ces concentrations élevées en LI, les cellulases peuvent établir des liaisons hydrogène avec l'anion constitutif du LI entraînant une inactivation totale des cellulases. Des deux LI, c'est l'[Emim][OAc] qui s'est montré le moins compatible avec les cellulases comme démontré dans les travaux de Auxenfans *et al.* (2017). En effet, la présence de l'[Emim][OAc] dans le milieu réactionnel provoque une diminution de l'activité des cellulases même à 10% (v/v) (rendement en glucose de 18% versus 25% pour le contrôle sans LI) (Auxenfans *et al.*, 2017).

Dans nos résultats, l'amélioration des rendements en glucose en présence du LI résiduel que ce soit de l'[Emim][OAc] ou de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] pourrait donc être attribuée à un compromis entre une meilleure accessibilité à la cellulose par les cellulases et une inactivation réduite des cellulases, en concordance avec Auxenfans *et al.* (2012) et Auxenfans *et al.* (2017).

### 3.1.2. *Kluyveromyces marxianus*

La deuxième levure modèle de fermentation des hexoses, *K. marxianus*, a été également étudiée pour la fermentation des hydrolysats enzymatiques de la cellulose.

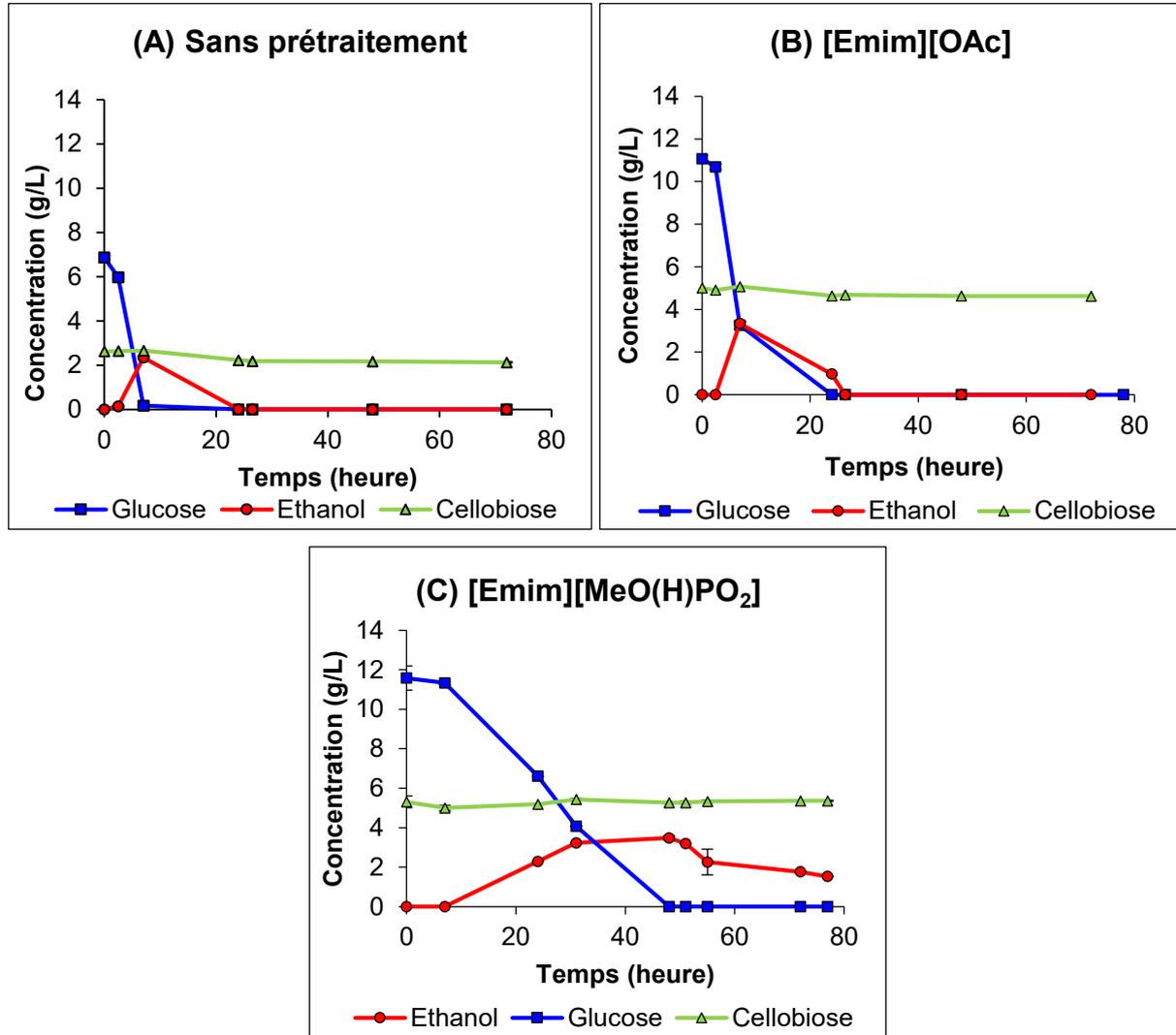
Les valeurs de  $DO_{600nm}$  maximales obtenues sont 20,1, 21,7 et 3,4 sur la cellulose non prétraitée, prétraitée à l'[Emim][OAc] et à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement (**Figure IV.12**). Les mesures de la  $DO_{600nm}$  reflétant la croissance des levures ont montré que *K. marxianus* présente une croissance importante sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] comme pour le contrôle sans prétraitement. Cependant, une faible croissance est observée dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], mettant à nouveau en évidence l'effet particulier de l'anion (MeO(H)PO<sub>2</sub>) sur *K. marxianus* comme sur *S. cerevisiae*.



**Figure IV.12.** Cinétiques de croissance de *K. marxianus* durant la SHF de la cellulose non prétraitée ou prétraitée aux LI à 30°C

Mehmood *et al.* (2018) ont également observé une croissance inférieure de la levure *K. marxianus* sur la cellulose longue fibre prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] par rapport à celle prétraitée à l'[Emim][OAc]. Or, d'après la même étude mais sur le milieu YM glucose en présence de faibles concentrations de LI, *K. marxianus* tolérait mieux l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] que l'[Emim][OAc]. En effet, la levure *K. marxianus* croît en présence de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] jusqu'à 4% (v/v) alors qu'aucune croissance n'a été observée au-delà de 1% (v/v) d'[Emim][OAc] (Mehmood *et al.*, 2018). Ceci peut être alors expliqué par le fait que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] reste plus piégé que l'[Emim][OAc] dans la cellulose prétraitée, et donc sa teneur résiduelle est probablement supérieure à 4% (v/v), ce qui conduit ainsi à une inhibition de la croissance de *K. marxianus*.

Au départ, les concentrations en glucose obtenues suite à l'hydrolyse enzymatique étaient plus importantes dans le cas de la cellulose prétraitée : 11,1 et 11,6 g/L pour l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement contre 6,9 g/L pour le contrôle sans prétraitement (**Figure IV.13**).



**Figure IV.13.** Cinétiques du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SHF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *K. marxianus* à 30°C

Par ailleurs, les concentrations initiales en cellobiose sont 2,6, 5,0 et 5,3 g/L pour la cellulose non prétraitée et prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement (**Figure IV.13**). L'accumulation du cellobiose dans les hydrolysats enzymatiques de la cellulose peut être due à la faible proportion de  $\beta$ -glucosidases dans le mélange de cellulases sécrété par le champignon *T. reesei*, ce qui a déjà été rapporté dans la littérature que non seulement ces enzymes sont produites en faible

proportion par *T. reesei* mais aussi qu'elles possèdent une activité faible, ce qui limite la conversion du cellobiose en glucose (Hari Krishna *et al.*, 2001 ; Sánchez and Cardona, 2008). Un moyen possible d'améliorer les rendements en glucose sera de compléter le mélange enzymatique *T. reesei* par des  $\beta$ -glucosidases d'*Aspergillus niger* par exemple (Sánchez and Cardona, 2008).

De plus, la concentration du cellobiose demeure constante tout au long des cultures indiquant que le cellobiose n'est pas consommé par *K. marxianus* et confirmant l'étude réalisée sur le cellobiose pur montrée dans le chapitre III (**Figure III.30 B**).

En outre, on note des profils différents de consommation du glucose entre la cellulose non prétraitée et prétraitée aux LI. Comme montré dans la **Figure IV.13**, *K. marxianus* consomme tout le glucose après 7 h dans le cas de la cellulose non prétraitée alors que la disparition du glucose a été notée entre 7 et 24 h dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc], probablement à cause de la concentration du glucose plus élevée dans ce dernier cas. Cependant, dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], le glucose est consommé plus lentement et disparaît au bout de 48 h même si sa concentration initiale était similaire au cas de l'[Emim][OAc]. Ces observations mettent en avant l'effet différent du LI ou plutôt de son anion constitutif sur le métabolisme de la levure rejoignant ainsi ce qui a été déjà constaté pour la croissance de *S. cerevisiae* sur cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].

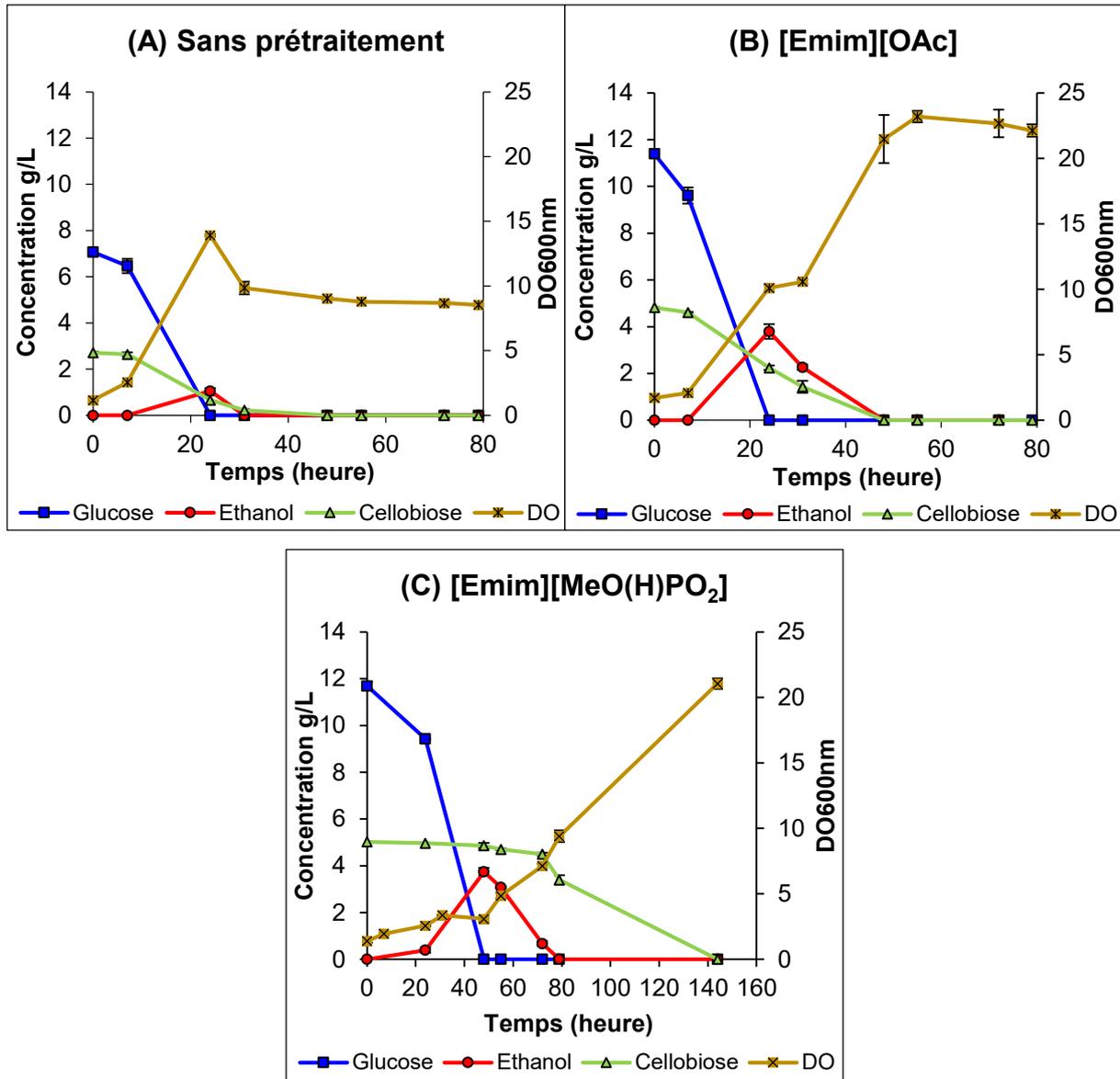
En ce qui concerne la production d'éthanol, les concentrations maximales en éthanol obtenues par *K. marxianus* à partir de la cellulose prétraitée aux LI ou non sont inférieures à celles obtenues avec *S. cerevisiae*. Elles sont atteintes lorsque les sucres sont totalement consommés, similairement à *S. cerevisiae*. En effet, on note un maximum d'éthanol de 2,3 g/L (20,7%), 3,3 g/L (29,4%) et 3,4 g/L (30,7%) à partir de la cellulose non prétraitée, prétraitée à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Si on considère pour le calcul des rendements, la concentration initiale en glucose dans le milieu, ces rendements s'élèvent jusqu'à 66,9, 58,8 et 59,1%, respectivement. Ces résultats permettent de constater que la présence du LI résiduel a causé une diminution de la production d'éthanol d'un facteur de 1,1 par rapport au contrôle avec une inhibition significative de la croissance exclusivement

pour l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Toutefois, il semble important de préciser que le maximum d'éthanol dans le cas de l'[Emim][OAc] est enregistré à 7 h alors qu'il reste encore 3,3 g/L du glucose dans le milieu. Il est donc possible que le maximum d'éthanol soit supérieur à 3,3 g/L mais que nous n'ayons pas fait le prélèvement (entre 7 et 24 h). Pareillement, dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] et pour des raisons pratiques aucun prélèvement n'a été réalisé entre 31 et 48 h. Il se peut ainsi que la consommation totale du glucose et l'apparition du maximum d'éthanol aient lieu durant cette période. Après épuisement des sucres, l'éthanol produit est consommé par les levures en tant que source de carbone jusqu'à devenir nul.

Une étude abordant le mécanisme de toxicité de l'[Emim][OAc] chez *S. cerevisiae* a identifié un mécanisme potentiel de toxicité des LI chez la levure (Dickinson *et al.*, 2016). En effet, les LI endommagent les fonctions de la mitochondrie probablement en induisant une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale (Dickinson *et al.*, 2016) qui peut finalement conduire à la production de dérivés réactifs de l'oxygène et par suite à l'apoptose (Pereira *et al.*, 2008). Ainsi, l'inhibition de la croissance de *K. marxianus* et également de *S. cerevisiae* (décrite plus haut) dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] pourrait être due à un dysfonctionnement mitochondrial, causé par sa concentration résiduelle qui semble être plus élevée que l'[Emim][OAc]. Le glucose étant un substrat fermentescible, son assimilation n'exige pas nécessairement la respiration liée à la mitochondrie puisqu'il peut être assimilé selon le métabolisme fermentaire qui prend place dans le cytoplasme (Dickinson *et al.*, 2016). C'est ce qui a été observé pour *K. marxianus* et *S. cerevisiae* dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] où les levures produisent de bons rendements éthanoliques malgré une croissance très faible (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018).

### 3.1.3. *Scheffersomyces shehatae*

La levure *S. shehatae* capable de fermenter à la fois les hexoses et le xylose a été également testée pour la fermentation des hydrolysats enzymatiques de la cellulose. Les résultats de l'évolution de la croissance de *S. shehatae* ainsi que les dosages du glucose, du cellobiose et de l'éthanol sont montrés dans la **Figure IV.14**.



**Figure IV.14.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SHF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

Les résultats de mesure de DO<sub>600nm</sub> ont montré une croissance importante de *S. shehatae* sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] (DO maximale de 23,2 à 55 h) (Figure IV.14 A) et supérieure à celle observée sans prétraitement (DO maximale de 13,9 à 24 h) (Figure IV.14 B). En revanche, sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], la phase de latence est plus longue que les deux autres conditions et une DO maximale de 21,1 est atteinte à 144 h (Figure IV.14 C). Cet effet particulier de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur *S. shehatae* se manifeste par un prolongement de la phase de latence mais pas une inhibition de la croissance comme observé pour

*S. cerevisiae* et *K. marxianus*. Ceci met en évidence que l'effet du même LI peut varier selon l'espèce de levure.

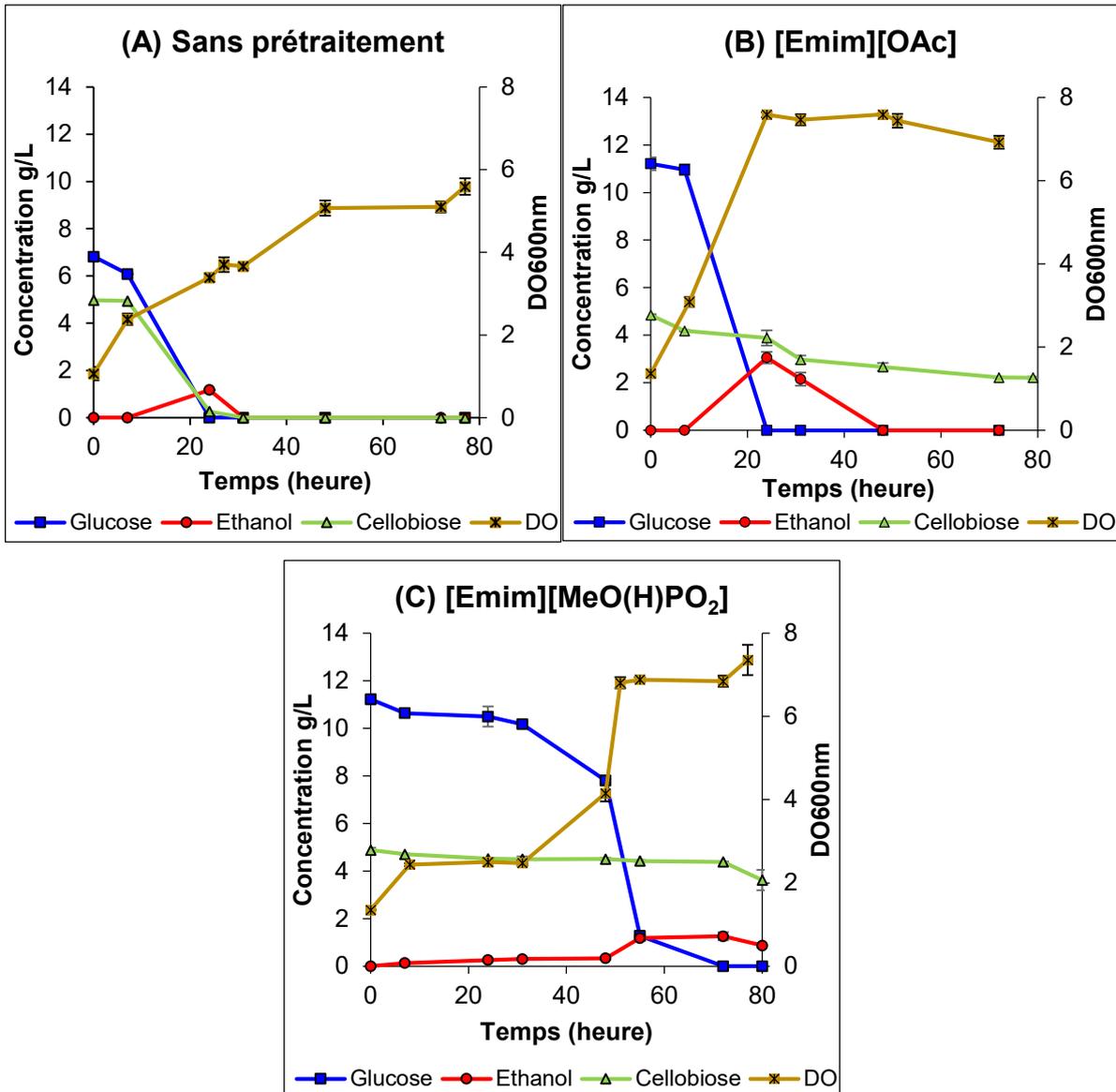
Comme pour la croissance, la consommation du sucre et la production d'éthanol ont montré un comportement différent de la levure selon le LI utilisé. En partant d'une concentration en glucose de 7,1 g/L dans le cas de la cellulose non prétraitée, 11,4 g/L pour l'[Emim][OAc] et 11,7 g/L pour l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], tout le glucose est consommé au même temps que le maximum d'éthanol est produit. Dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc], la consommation totale du glucose est observée après 24 h similairement au contrôle sans prétraitement alors que pour la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], cette consommation est retardée de 24 h et a lieu à 48 h (**Figure IV.14 C**). Ce retard est possiblement dû à la présence d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel dans le milieu qui influence la croissance et le métabolisme de la levure.

La concentration maximale en éthanol notée à partir de la cellulose sans prétraitement est de 1,1 g/L, alors qu'elle s'élève à 3,8 et 3,7 g/L après prétraitement à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Le prétraitement de la cellulose aux LI améliore donc significativement les rendements en éthanol par *S. shehatae* soit une augmentation d'un facteur de 3,5 et 3,4 après prétraitement à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Ces concentrations maximales correspondent en terme de rendement à 9,3%, 33,4% et 32,9%, respectivement (en considérant la cellulose en tant que substrat pour le calcul). Cependant, si la concentration en glucose initialement présente dans le milieu est prise en compte, les rendements respectifs augmentent à 30,3%, 69,4% et 64,1%. Ces résultats soulignent ainsi que la présence du LI résiduel que ce soit l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] n'affecte pas le métabolisme fermentaire du glucose chez la levure mais au contraire la production d'éthanol est améliorée. Ceci en accord avec ce qui a été rapporté par les études effectuées par notre équipe au laboratoire qui indiquent que pour *S. cerevisiae*, l'addition de 1% d'[Emim][OAc] ou 4% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] dans le milieu YM glucose améliore la production d'éthanol d'un facteur de 1,6 et 1,4, respectivement (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018). De même, la production d'éthanol par *K. marxianus* est augmentée respectivement, d'un facteur de 1,2 et 1,4 suite à l'addition de 1% d'[Emim][OAc] ou 3% d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018).

Par ailleurs, il est remarquable que le cellobiose libéré depuis l'étape d'hydrolyse enzymatique est consommé par *S. shehatae* (**Figure IV.14**), contrairement aux deux autres espèces décrites plus haut, *S. cerevisiae* et *K. marxianus*. Cependant, le cellobiose consommé n'est pas fermenté en éthanol vu qu'au fur et à mesure de sa consommation, la concentration d'éthanol diminue. Une explication possible est que les levures s'en servent pour leur croissance. Ces résultats confirment nos observations précédentes (chapitre III) obtenues sur le cellobiose pur qui a été consommé par *S. shehatae* pour la production de biomasse cellulaire et non pas de l'éthanol (**Figure III.30 B**). Le fait d'observer dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] une DO maximale pour *S. shehatae*, plus élevée que celles pour *S. cerevisiae* et *K. marxianus* qui ne consommaient pas le cellobiose, pourrait soutenir cette hypothèse. Toutefois, il est remarquable que le cellobiose est consommé entièrement et plus rapidement dans le cas de l'[Emim][OAc], contrairement au cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] où la concentration résiduelle est de 3,9 g/L après 144 h. Ceci est en corrélation avec la phase de latence plus longue observée dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] et donc une consommation tardive du cellobiose.

#### 3.1.4. *Scheffersomyces stipitis*

*S. stipitis* a été également étudiée sur hydrolysats enzymatiques de la cellulose non prétraitée ou prétraitée aux LI. Le suivi de la croissance de la levure montre une faible croissance de *S. stipitis* sur hydrolysats enzymatiques de la cellulose que ce soit avec ou même sans prétraitement en comparaison avec celle sur YM glucose (DO maximale = 26,4, chapitre III, **Figure III.13**). En effet, on note une DO maximale de 5,1 à 48 h pour le contrôle sans prétraitement et une DO maximale légèrement plus élevée après prétraitement : 7,6 à 24 h dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] et 7,4 à 77 h pour la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**Figure IV.15**).



**Figure IV.15.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SHF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. stipitis* à 30°C

La croissance plus élevée observée dans le cas de la cellulose prétraitée aux LI pourrait être due à la concentration initiale en glucose plus élevée à celle du contrôle sans prétraitement. Bien que les DO maximales sont atteintes à des temps différents, elles sont proches pour les deux LI. *S. stipitis* présente un comportement vis-à-vis des deux LI différent des 3 autres souches décrites plus haut et sa croissance n'a pas été réduite par l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel mais plutôt ralentie de 27 h comparée à l'[Emim][OAc]. Ces résultats soulignent le fait que pour le même LI les microorganismes notamment les levures pourraient se comporter différemment,

comme il a été rapporté dans des études précédentes (Sitepu *et al.*, 2014 ; Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018). Ceci peut être lié à la différence de la composition en polysaccharides des parois cellulaires selon l'espèce de levure ce qui pourrait influencer les interactions entre LI et paroi cellulaire des levures.

Par ailleurs, les concentrations en sucres et éthanol représentées également en **Figure IV.15**, montrent que le métabolisme fermentaire de *S. stipitis* dépend de la nature du LI résiduel, notamment de son anion constitutif. Tout d'abord, dans le cas de la cellulose non prétraitée, le glucose dont la concentration initiale est de 6,8 g/L est totalement consommé après 24 h. Le maximum d'éthanol produit est de 1,2 g/L (correspondant à un rendement de 10% par rapport à la concentration initiale en cellulose) coïncidant à la consommation totale du glucose. Dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc], le glucose dont la concentration initiale est égale à 11,2 g/L est totalement consommé après 24 h, comme pour le contrôle. Le maximum d'éthanol produit dans ce cas est de 3,1 g/L représentant un rendement de 27% (par rapport à la concentration initiale en cellulose). Puis, sa concentration diminue ce qui est dû à sa consommation par la levure après épuisement du sucre. Dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], le glucose, ayant une concentration initiale de 11,2 g/L, est totalement consommé à 72 h. Cependant, la production d'éthanol est moins importante soit 1,3 g/L correspondant à un rendement de 11% (par rapport à la concentration initiale en cellulose). La concentration maximale en éthanol observée dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] est similaire à celle obtenue sans prétraitement. Le LI résiduel exerce selon l'anion constitutif un effet différent sur le métabolisme de *S. stipitis* plutôt que sur sa croissance.

Le prétraitement à l'[Emim][OAc] montre un effet plus important que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur l'amélioration de la production d'éthanol par *S. stipitis* en augmentant les rendements d'un facteur de 2,6 et 1,1, respectivement par rapport au contrôle. Ces résultats mettent le point sur l'effet différent que peuvent avoir deux LI différents sur le même microorganisme.

En terme de rendements en fonction de la concentration du glucose présente dans le milieu au début de la culture, *S. stipitis* produit 33,7, 55,3 et 22,0% sur la cellulose non prétraitée et prétraitée à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Le prétraitement de la cellulose à l'[Emim][OAc] améliore donc le rendement éthanolique maximale d'un facteur de 1,6. Cependant, le rendement

éthanolique maximal baisse d'un facteur de 1,5 après prétraitement de la cellulose à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] en comparaison avec le contrôle. Or, Srilekha Yadav *et al.* (2011) ont constaté que la production d'éthanol par *S. stipitis* est améliorée en augmentant la concentration initiale en sucre dans le milieu. Dans notre cas, les faibles rendements en éthanol obtenus après prétraitement de la cellulose à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] par rapport au contrôle sans prétraitement, malgré des concentrations initiales en glucose plus élevées, seraient probablement dus à l'effet du LI résiduel. Toutefois, le prétraitement de la cellulose à l'[Emim][OAc] aboutit à un rendement éthanolique plus élevé que dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé dans le chapitre III sur les cultures de *S. stipitis* sur glucose en présence de faibles concentrations en LI. En effet, la présence de 0,5% (v/v) d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] diminue la concentration maximale en éthanol (de 6,8 g/L pour le contrôle à 3,2 g/L) sur glucose alors qu'une même concentration d'[Emim][OAc] (0,5% v/v) conduit à une production d'éthanol proche (5,5 g/L) de celle du contrôle (6,1 g/L), mais qui diminue pour des concentrations supérieures à 0,5% v/v.

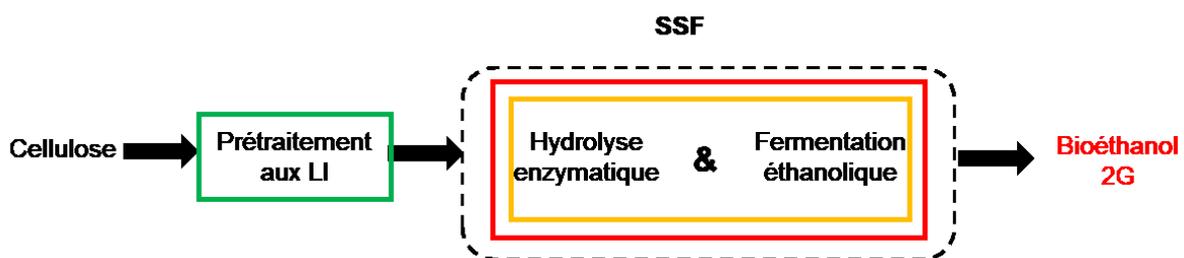
Enfin, après avoir étudié les quatre espèces de levures sur hydrolysats enzymatiques de cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], il est constaté que l'effet du LI résiduel dans la cellulose prétraitée varie en fonction de l'anion constitutif du LI et de l'espèce de levure considérée. Toutefois, l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] présente un effet plus remarquable que l'[Emim][OAc] particulièrement sur la croissance des levures. Ainsi, le LI résiduel semble affecter la croissance des levures : inhibition de la croissance dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur *S. cerevisiae*, pourtant la production éthanolique est améliorée par rapport au contrôle et est similaire à celle pour l'[Emim][OAc]. Le même effet de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] a été également noté sur la croissance de *K. marxianus* mais les deux LI semblent diminuer légèrement les rendements éthanoliques par rapport au contrôle. En outre, la levure *S. shehatae* a montré une phase de latence plus longue dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] mais sans que sa croissance soit inhibée ou diminuée avec une amélioration des rendements éthanoliques par rapport au contrôle. Cependant, dans le cas de *S. stipitis*, l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel provoque une phase de latence plus longue et une consommation tardive de sucres

accompagnée d'une diminution de la production d'éthanol par rapport au contrôle, contrairement à l'[Emim][OAc].

### 3.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF

Des recherches ont démontré que le procédé simultané SSF de la saccharification enzymatique de la cellulose en glucose et de fermentation de ce dernier en éthanol améliore la cinétique de conversion de cellulose en réduisant l'accumulation de produits de l'hydrolyse (cellobiose et glucose) qui exercent une inhibition des endo-cellulases et de la  $\beta$ -glucosidase. En plus, le procédé simultané SSF présente un autre avantage de minimiser le risque de contamination à cause de la présence de l'éthanol et le coût d'équipement requis (Hasunuma and Kondo, 2012).

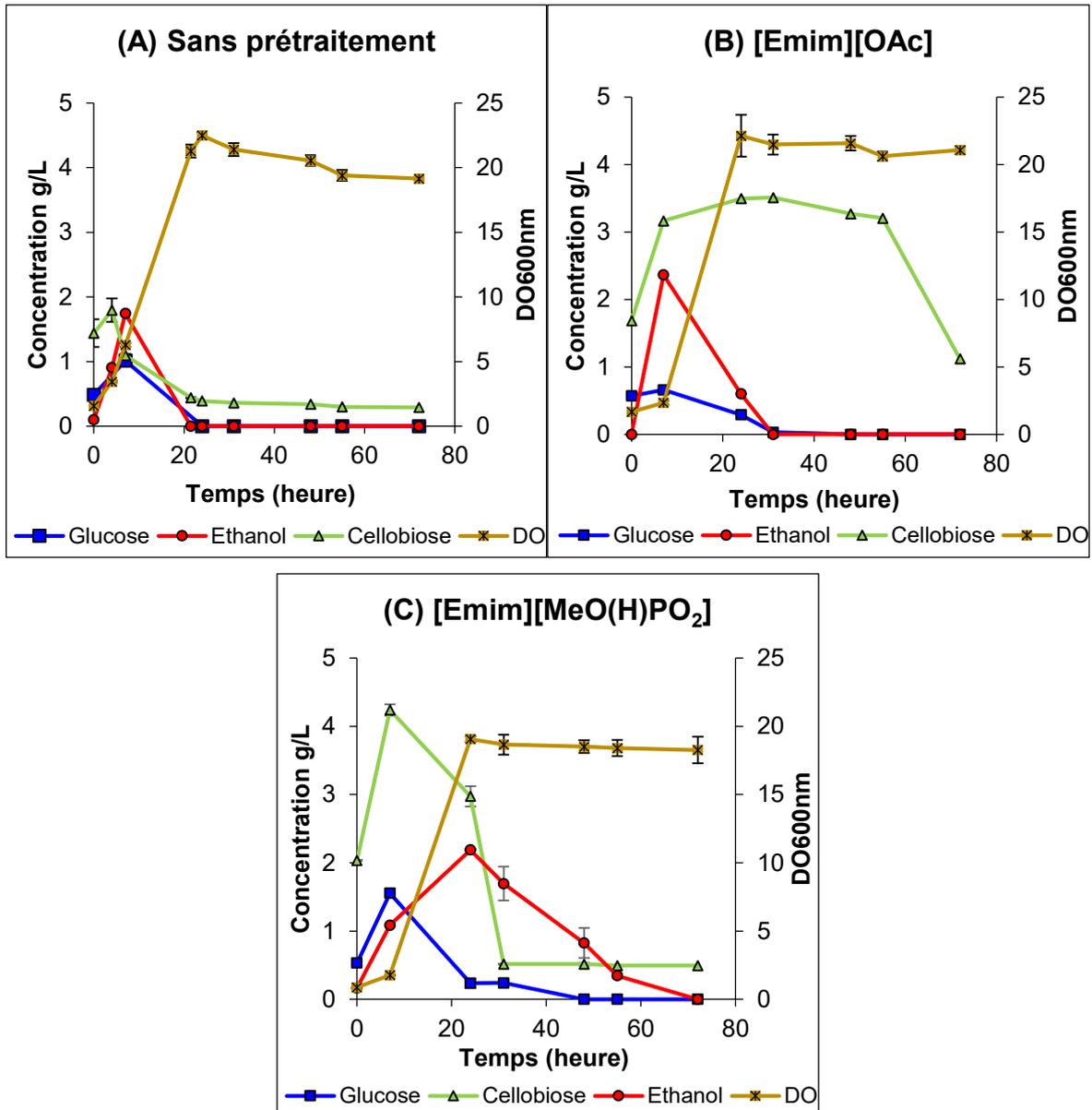
L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de combiner les étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique (**Figure IV.16**) sur la production d'éthanol par les quatre levures et de la comparer à celle obtenue en SHF. La SSF est également réalisée sur polymères modèles en tampon acétate (50 mM, pH 4,8) à 30°C et les concentrations finales en substrat et en enzyme sont de 20 g/L et 1 mg/mL, respectivement. La fermentation éthanolique est étudiée pour chacune des 4 espèces de levures : *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* et *S. stipitis*. Chaque condition a été répétée deux fois pour la cellulose non prétraitée et prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].



**Figure IV.16.** Schéma représentant le procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique de la cellulose, SSF

#### 3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Les mesures de la DO<sub>600nm</sub> enregistrées lors de la SSF de la cellulose avec *S. cerevisiae* et l'évolution de la concentration de chacun du glucose, du cellobiose et de l'éthanol sont montrées dans la **Figure IV.17**.



**Figure IV.17.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SSF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. cerevisiae* à 30°C

Sur la cellulose non prétraitée, *S. cerevisiae* se développe bien avec un maximum de DO<sub>600nm</sub> de 22,4, enregistré à 24 h. La présence du LI résiduel dans le milieu provenant du prétraitement préalable de la cellulose semble avoir peu d'effet sur la croissance de la levure. En effet, *S. cerevisiae* pousse sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] jusqu'à une DO<sub>600nm</sub> maximale de 22,1 alors que sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] la DO<sub>600nm</sub> maximale est de 19,1. Ainsi, durant le procédé SSF de la cellulose prétraitée ou non aux LI, la levure *S. cerevisiae* présente la même allure de courbes de croissance dans les trois conditions testées avec un

maximum de DO qui se situe autour de 20. Cependant, ces observations étaient différentes en SHF, particulièrement dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] où la croissance de la levure était très limitée. Une explication possible serait que l'effet du LI, notamment l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] pourrait être corrélé à la concentration initiale de glucose présente dans le milieu de culture. En effet, en SHF la concentration en glucose initialement présente est plus élevée qu'en SSF où le glucose est directement consommé au fur et à mesure de sa libération. De plus, le fait que les cellulases sont présentes dans le milieu de culture avec les levures pourrait suggérer que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel interagit avec les cellulases et les parois des levures également ce qui diminue son effet inhibiteur sur la croissance cellulaire.

Une augmentation de la concentration de cellobiose dans le milieu réactionnel est observée jusqu'à une valeur maximale de 4,2 g/L à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] et de 3,5 g/L après prétraitement à l'[Emim][OAc] contre 1,8 g/L à partir de la cellulose non prétraitée (**Figure IV.17**). Ceci met en avant une meilleure accessibilité des enzymes après prétraitement de la cellulose aux LI par rapport au contrôle. Cependant, le profil de la cinétique du cellobiose est influencé par l'anion constitutif du LI résiduel. En effet, le cellobiose dans le cas de l'[Emim][OAc] reste plus accumulé dans le milieu en comparaison avec l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Le cellobiose libéré est hydrolysé en monomères de glucose suite à l'action des enzymes  $\beta$ -glucosidases contenues dans le mélange enzymatique cellulolytique utilisé. Puisqu'il s'agit d'un procédé simultané d'hydrolyse et de fermentation, le glucose une fois libéré dans le milieu réactionnel est directement assimilé par les levures.

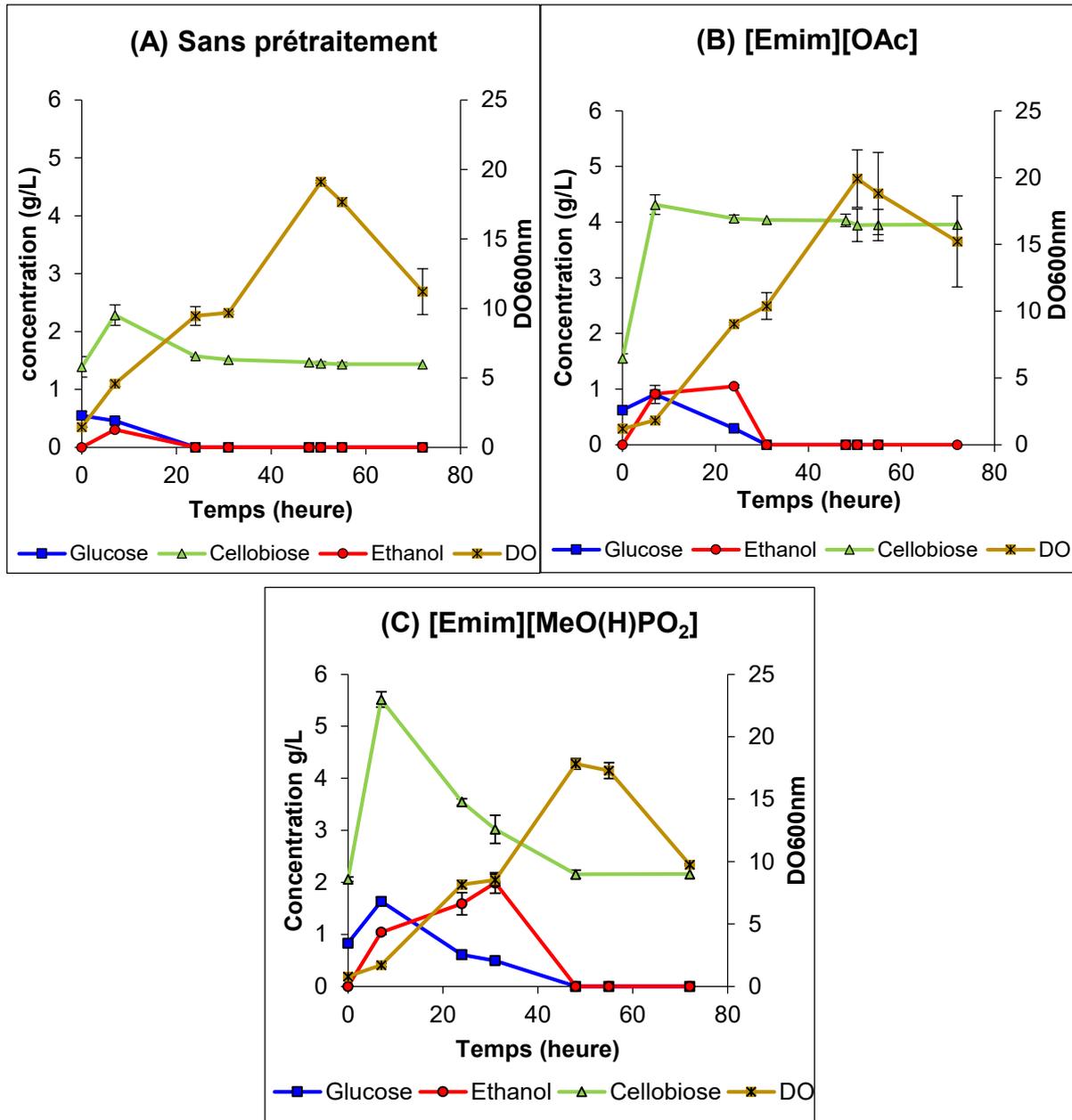
Dans le cas de la cellulose non prétraitée, *S. cerevisiae* produit de l'éthanol dont la concentration maximale ne dépasse pas 1,7 g/L (**Figure IV.17**), correspondant à un rendement de 15,4% (en fonction de la concentration initiale de cellulose). D'autre part, le prétraitement de la cellulose aux LI conduit à une production d'éthanol légèrement plus importante par *S. cerevisiae*. En effet, on note une concentration maximale en éthanol de 2,4 g/L (correspondant à un rendement éthanolique de 20,8%) et 2,2 g/L (19,3%) à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] et à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement (**Figure IV.17**). Puis, l'éthanol produit est consommé et devient nul en fin de culture.

La production d'éthanol par *S. cerevisiae* était plus importante durant le procédé séquentiel SHF où le prétraitement aux LI a permis une production maximale d'éthanol

de 5,6 g/L. Ces résultats contredisent ce qui a été rapporté dans la littérature décrivant l'efficacité de la SSF à améliorer les rendements en éthanol en évitant la retro inhibition des cellulases par les produits d'hydrolyse (Olofsson *et al.*, 2008a). Les rendements inférieurs en éthanol obtenus en SSF par rapport à la SHF pourraient être dus à la faible concentration en glucose qui est libéré dans le milieu au fur et à mesure et qui n'atteint pas alors une concentration élevée, ce qui pourrait orienter le métabolisme de la levure davantage vers la synthèse de biomasse cellulaire ou d'autres métabolites plutôt que vers la synthèse d'éthanol.

### 3.2.2. *Kluyveromyces marxianus*

En SSF, pour les 3 conditions étudiées, *K. marxianus* présente la même allure de courbe de croissance avec un maximum de DO qui se situe autour de 20 comme si la présence du LI résiduel n'a pas d'effet significatif sur la croissance des levures (**Figure IV.18**).



**Figure IV.18.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SSF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *K. marxianus* à 30°C

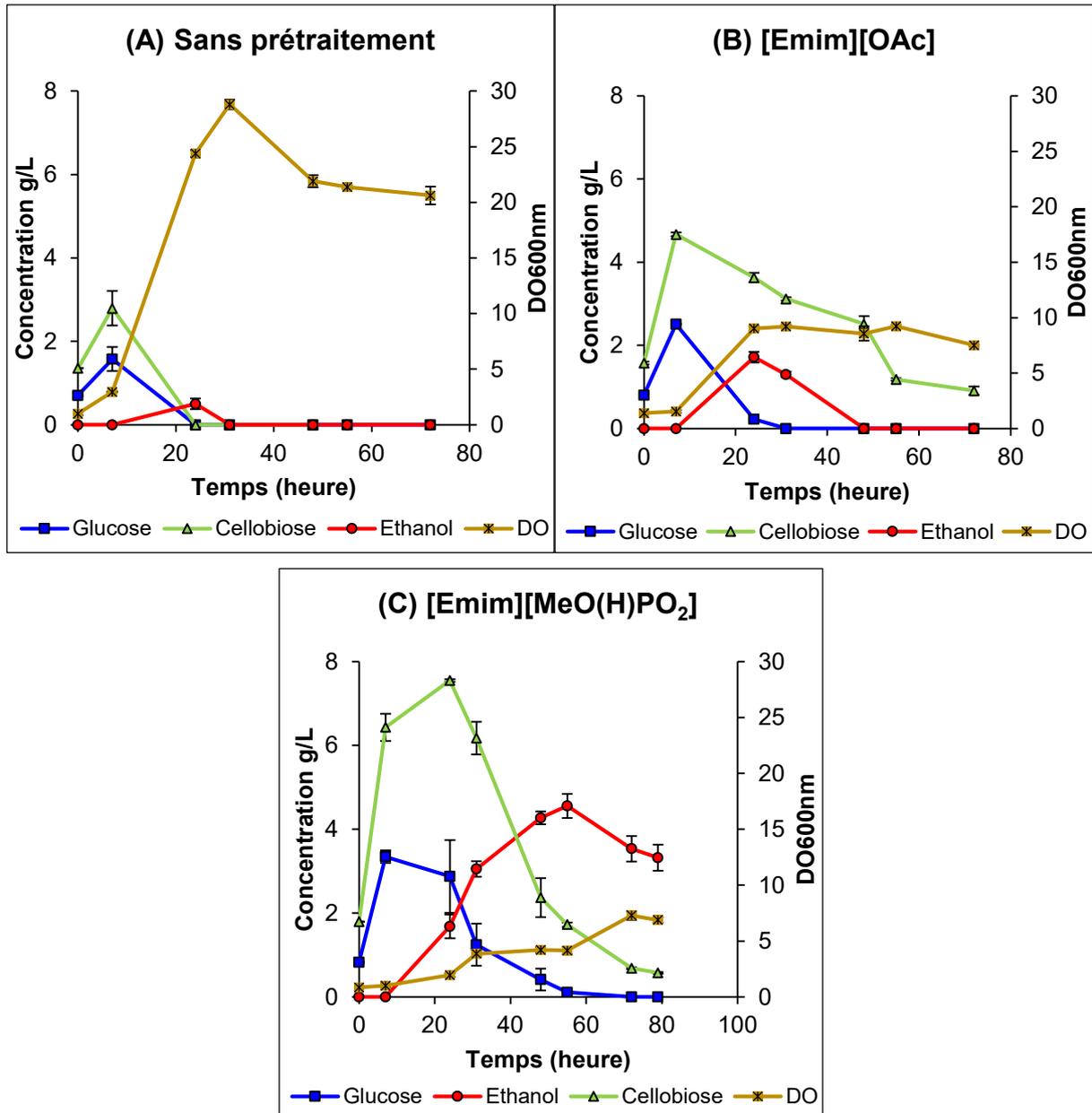
Contrairement aux observations lors de la SHF, la croissance de *K. marxianus* n'est pas affectée par la présence d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel et la DO maximale atteinte après 48 h est de 17,8 et très proche à celle dans le cas de l'[Emim][OAc] (19,2 à 50,5 h). Ensuite, se produit une chute de DO observée en fin de culture de *K. marxianus* pour les 3 conditions testées.

On observe un rendement en éthanol plus élevé lorsque la cellulose a été prétraînée : 1,1 g/L dans le cas de l'[Emim][OAc] et 2,0 g/L pour l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], contre 0,3 g/L pour le contrôle sans prétraitement (**Figure IV.18**). Cependant, les rendements en éthanol obtenus en SSF sont inférieurs à la SHF qui étaient de 2,3, 3,3 et 3,4 g/L, respectivement. Ceci met en avant l'effet de la concentration du glucose présente dans le milieu de culture qui est plus faible en SSF qu'en SHF car le glucose est directement consommé par les levures une fois qu'il est libéré. Les enzymes, simultanément présentes avec les levures, peuvent interagir avec les parois de celles-ci (formées de polysaccharides), ce qui pourrait perturber la structure des parois et influencer le métabolisme fermentaire des levures.

Au vu de la littérature, la production d'éthanol par les levures dépend intimement de la concentration du sucre présent dans le milieu de culture et également de la levure utilisée (Mohd Azhar *et al.*, 2017 ; Amaya-Delgado *et al.*, 2018). Les travaux de Sandoval-Nuñez *et al.* (2018) ont montré que les rendements éthanoliques obtenus par *K. marxianus* sur hydrolysats de bagasse de canne à sucre ou de paille de blé varient en fonction de la concentration de sucres dans le milieu et de la souche utilisée. Les auteurs ont trouvé un rendement éthanolique par *K. marxianus* SLP<sub>1</sub> de 0,49 g éthanol/g sucre à partir d'une concentration en sucres de 18,5 g/L alors que le rendement diminue à 0,21 g éthanol/g sucre lorsque la concentration en sucres était de 14,5 g/L. De plus, le même effet de la concentration en sucres était noté sur une autre souche *K. marxianus* OFF<sub>1</sub> avec toutefois des rendements éthanoliques inférieurs : 0,28 et 0,16 g éthanol/g sucre à partir d'une concentration en sucres de 18,5 et 14,5 g/L, respectivement (Sandoval-Nuñez *et al.*, 2018).

### 3.2.3. *Scheffersomyces shehatae*

En SSF, on note une DO maximale de 28,8 sur la cellulose non prétraînée, 9,2 sur la cellulose prétraînée à l'[Emim][OAc] et 7,3 sur celle prétraînée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**Figure IV.19**). Sur la cellulose non prétraînée, la croissance importante de *S. shehatae* résulte de l'assimilation à la fois du glucose et du cellobiose puisqu'elle s'est précédemment montrée capable d'assimiler ce disaccharide pour sa croissance (chapitre III, **Figure III.30**). Comme, la croissance de la levure est plus importante sur la cellulose non prétraînée que sur celle prétraînée aux LI, la présence de LI résiduel semble avoir un effet inhibiteur sur la croissance de *S. shehatae*.



**Figure IV.19.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SSF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

De plus, on remarque un profil différent du cellobiose entre les trois conditions testées. Sur la cellulose non prétraitée, la concentration du cellobiose augmente jusqu'à 2,8 g/L à 7 h puis elle diminue jusqu'à devenir nulle. Dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc], le cellobiose augmente jusqu'à 4,7 g/L à 7 h puis il diminue progressivement jusqu'à une valeur de 0,9 g/L en fin de culture. Cette augmentation de la concentration du cellobiose est due à l'effet bénéfique du prétraitement à augmenter l'accessibilité des endo-cellulases. Cependant, dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>],

on note l'augmentation la plus élevée de la concentration du cellobiose jusqu'à 7,6 g/L mais qui est observée à 24 h, plus tard que l'[Emim][OAc] (7 h). Ceci est expliqué par une accumulation du glucose observée dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] contrairement aux deux autres conditions et qui semble exercer une inhibition sur les  $\beta$ -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose en glucose. Ces résultats mettent en avant que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel induit une consommation tardive du glucose et du cellobiose chez *S. shehatae*.

Le maximum d'éthanol est observé au bout de 24 h dans le cas de la cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] et est respectivement, de 0,5 et 1,7 g/L (ce qui correspond à un rendement de 4,4 et 15,2%, respectivement) (**Figure IV.19**). Cependant, dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], la production maximale d'éthanol est de 4,5 g/L à 55 h correspondant à un rendement de 40,2%.

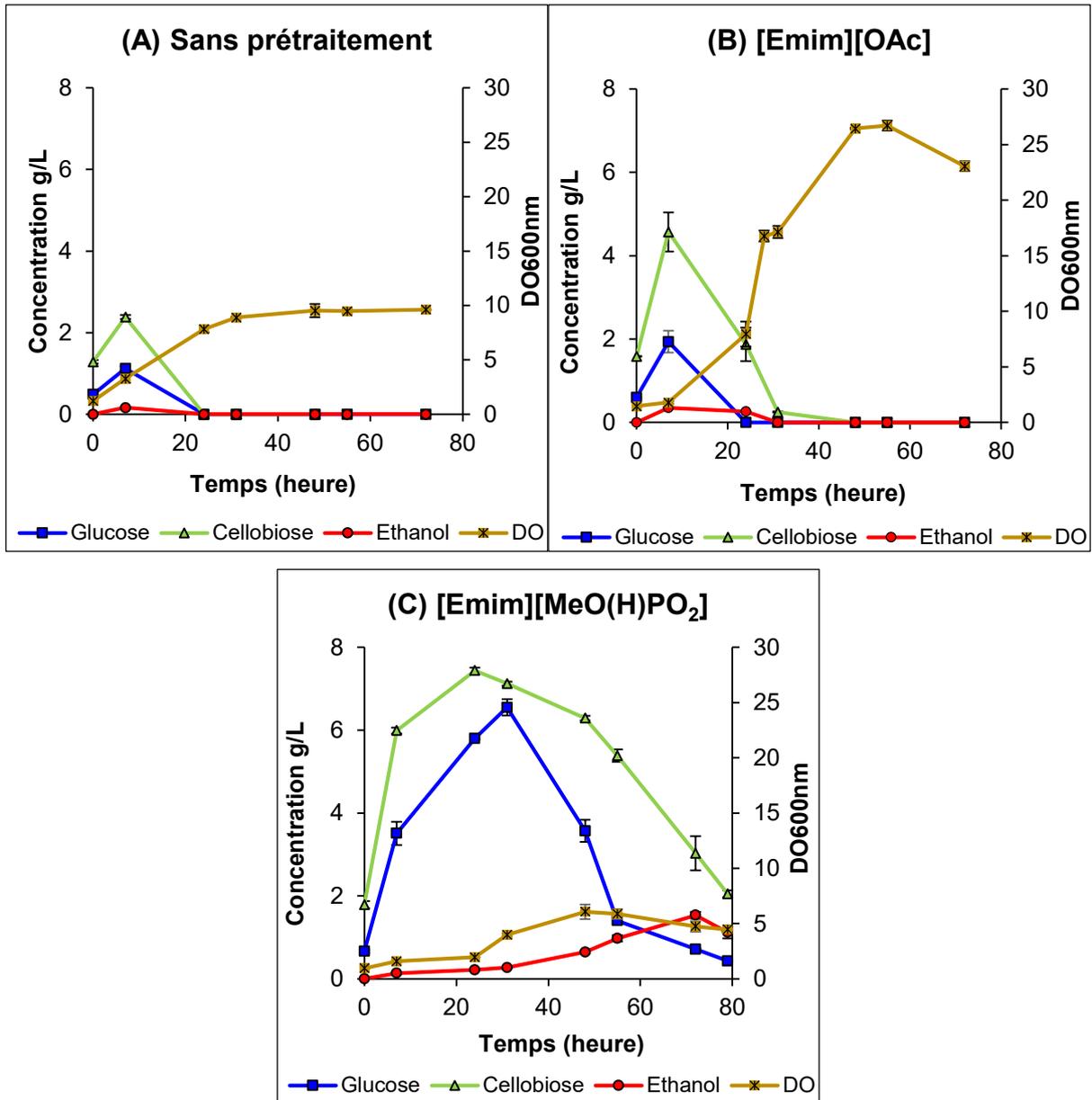
Ainsi, le prétraitement aux LI génère des rendements en éthanol plus importants que ceux pour le contrôle sans prétraitement. Bien que l'[Emim][OAc] permette d'obtenir des rendements en éthanol 3,7 fois plus élevés que ceux du contrôle, l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] génère une augmentation d'un facteur de 9. Ces résultats montrent particulièrement l'effet marquant de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur l'augmentation de la production d'éthanol par *S. shehatae* présentant le meilleur rendement parmi les 4 espèces de levures testées en SSF.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus en SHF, on trouve une différence aussi bien pour la croissance que pour la production d'éthanol. En effet, en SHF les DO maximales respectives étaient de 13,9, 23,2 et 21,1 sur la cellulose non prétraitée, prétraitée à l'[Emim][OAc] et à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. En SSF, la croissance de *S. shehatae* sur cellulose non prétraitée (DO maximale de 28,8) plus importante qu'en SHF peut être la conséquence du procédé simultané SSF et donc d'une quantité plus élevée du cellobiose libéré qui sera directement assimilé par les levures pour croître. En revanche, en SSF la croissance de *S. shehatae* sur cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] est plus faible (DO maximale de 9,2 et 7,3, respectivement) que celle observée en SHF pour les deux LI (DO maximale de 23,2 et 21,1, respectivement). Ainsi, cette diminution de la croissance en SSF peut être due à l'effet combiné du LI résiduel et de la concentration en glucose (plus faible qu'en SHF) dans le milieu. Quant à la production d'éthanol, elle est plus faible sur la cellulose non prétraitée en SSF (concentration maximale de 0,5 g/L) qu'en SHF (concentration

maximale de 1,1 g/L) ce qui est dû à la concentration plus faible du glucose dans le milieu, en SSF. Bien que l'effet combiné du LI résiduel et de la faible concentration en glucose observé en SSF sur la croissance de *S. shehatae* soit proche pour les 2 LI, l'effet sur la production d'éthanol est pourtant différent. En SHF, les concentrations maximales en éthanol sont de 3,8 et 3,7 g/L sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Cependant, en SSF, on note une augmentation de la production d'éthanol d'un facteur de 1,2 dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] par rapport à la SHF alors qu'une diminution de la production d'éthanol d'un facteur de 2,2 est notée pour l'[Emim][OAc].

#### 3.2.4. *Scheffersomyces stipitis*

Pour le contrôle sans prétraitement, on note un maximum de DO de 9,6. La levure *S. stipitis* montre la croissance la plus importante sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] avec une DO maximale de 26,7. Alors que sur le milieu YM glucose, la présence de faibles concentrations en [Emim][OAc] prolongeait la phase de latence de *S. stipitis*, ce n'est pas le cas ici sur la cellulose. De plus, cette importante croissance de *S. stipitis* sur cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] par rapport à la cellulose non prétraitée est un résultat curieux, pourtant on a répété les expériences plusieurs fois, avec toujours des résultats pareils. Par contre, la croissance de la levure sur la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] est faible avec une DO maximale de 6,1 (**Figure IV.20**).



**Figure IV.20.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SSF de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. stipitis* à 30°C

Une très faible concentration d'éthanol de 0,2 g/L (rendement de 1,5%) est détectée à partir de la cellulose non prétraitée mais aussi à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] où une concentration maximale de 0,4 g/L (rendement de 3,1%) seulement est obtenue. C'est dans cette condition que *S. stipitis* montre une croissance très importante et la plus élevée en comparaison aux deux autres conditions. Ceci permet de suggérer que la quasi-totalité du glucose présent dans le milieu est utilisée par la levure pour sa croissance et n'a pas été dirigée vers la

fermentation éthanolique. Ceci pourrait être dû à l'effet de l'[Emim][OAc] résiduel qui favorise la biosynthèse cellulaire de levures en présence de faibles concentrations initiales en glucose contrairement à la SHF où la croissance était significativement plus faible (DO maximale de 7,6) et la production d'éthanol largement plus élevée (concentration maximale de 3,1 g/L en SHF contre 0,4 g/L en SSF) d'un facteur de 8,6.

Cependant, le prétraitement de la cellulose à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] permet de produire 1,5 g/L d'éthanol (13,5%) (**Figure IV.20**) et ainsi augmente les rendements d'un facteur de 9,5 par rapport au contrôle. Comme montré dans la **Figure IV.20**, dans le cas de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], une accumulation du glucose et du cellobiose a été constatée, ce qui est probablement dû à l'effet particulier de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur le métabolisme de la levure. Cet effet qui se manifeste par une assimilation tardive du glucose et contribue donc à une augmentation de sa concentration jusqu'à 6,5 g/L. La concentration du glucose dans le milieu est donc plus élevée que dans le cas de l'[Emim][OAc], ce qui favorise la fermentation éthanolique qui dépend de la concentration du glucose.

Les DO<sub>600nm</sub> maximales et les rendements éthanoliques maximaux obtenus par les quatre espèces de levures sur la cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] en SHF et en SSF sont regroupés dans le **Tableau IV.1** et le **Tableau IV.2**, respectivement.

**Tableau IV.1.** DO<sub>600nm</sub> maximales obtenues par les quatre espèces de levures sur la cellulose pour les différentes conditions testées

Condition	Espèce de levure utilisée			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>S. shehatae</i>	<i>S. stipitis</i>
<b>SHF Sans prétraitement</b>	20,5 ± 0,4	20,1 ± 0,6	13,9 ± 0,1	5,6 ± 0,2
<b>SSF Sans prétraitement</b>	22,5 ± 0,3	19,1 ± 0,1	28,8 ± 0,4	9,6 ± 0,0
<b>SHF [Emim][OAc]</b>	18,6 ± 0,1	21,7 ± 0,4	23,2 ± 0,4	7,6 ± 0,0
<b>SSF [Emim][OAc]</b>	22,1 ± 1,5	19,9 ± 2,1	9,2 ± 0,1	26,7 ± 0,5
<b>SHF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	4,5 ± 0,5	3,4 ± 0,3	21,1 ± 0,4	7,4 ± 0,3
<b>SSF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	19,1 ± 0,2	17,8 ± 0,4	7,3 ± 0,2	6,1 ± 0,1

**Tableau IV.2.** Rendements éthanoliques maximaux (en %) obtenus par les quatre espèces de levures sur la cellulose pour les différentes conditions testées

Condition	Espèce de levure utilisée			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>S. shehatae</i>	<i>S. stipitis</i>
<b>SHF Sans prétraitement</b>	34,9 ± 2,0%	20,7 ± 0,0%	9,3 ± 1,1%	10,4 ± 0,1%
<b>SSF Sans prétraitement</b>	15,4 ± 0,6%	2,7 ± 0,1%	4,4 ± 1,1%	1,5 ± 0,2%
<b>SHF [Emim][OAc]</b>	49,8 ± 0,6%	29,9 ± 0,7%	33,5 ± 2,8%	26,9 ± 2,2%
<b>SSF [Emim][OAc]</b>	20,8 ± 1,1%	9,3 ± 0,2%	15,2 ± 1,1%	3,1 ± 0,0%
<b>SHF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	49,5 ± 1,1%	30,7 ± 1,0%	33,0 ± 1,5%	11,1 ± 1,5%
<b>SSF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	19,3 ± 0,1%	17,5 ± 1,7%	40,2 ± 2,6%	13,5 ± 0,7%

Ainsi, à la lumière des résultats montrés dans les **Tableaux IV.1** et **2**, on remarque que le LI résiduel dans la cellulose prétraitée montre un impact différent sur la croissance des levures selon l'espèce étudiée et l'anion constitutif du LI.

Quant à la production d'éthanol, elle est généralement plus élevée après prétraitement de la cellulose en raison de la concentration en glucose plus élevée. Sur la cellulose non prétraitée, *S. cerevisiae* produit des rendements éthanoliques plus élevés en comparaison avec les autres espèces, que ce soit en SHF ou en SSF, avec un rendement en éthanol plus élevé en SHF (34,9%) qu'en SSF (15,4%).

En SHF, les deux LI utilisés pour le prétraitement de la cellulose : l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ne montrent pas de différence significative entre les rendements éthanoliques obtenus, par *S. cerevisiae* (49,8 et 49,5%), *K. marxianus* (29,9 et 30,7%) et *S. shehatae* (33,5 et 33,0%). Cependant, *S. stipitis* génère en SHF, un rendement éthanolique plus élevé à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] (26,9%) par rapport à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (11,1%).

En SSF, *S. cerevisiae* produit des rendements éthanoliques similaires à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] (20,8%) ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (19,3%), mais ces rendements sont inférieurs à ceux de la SHF. De même, *K. marxianus* produit moins d'éthanol en SSF qu'en SHF, mais le rendement éthanolique maximal obtenu en SSF dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (17,5%) est supérieur à celui dans le cas de l'[Emim][OAc] (9,3%). Cependant, pour *S. shehatae* et *S. stipitis*, les rendements maximaux en éthanol sont améliorés en SSF par rapport à la SHF, uniquement dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (40,2% contre 33,0% pour *S. shehatae* et 13,5% contre 11,1% pour *S. stipitis*). De plus, le meilleur rendement éthanolique obtenu en SSF est produit par *S. shehatae* à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ainsi, l'effet du LI résiduel sur les rendements éthanoliques varie selon l'espèce de levure, l'anion du LI et aussi le type du procédé appliqué, SHF ou SSF (et donc de la concentration en glucose dans le milieu).

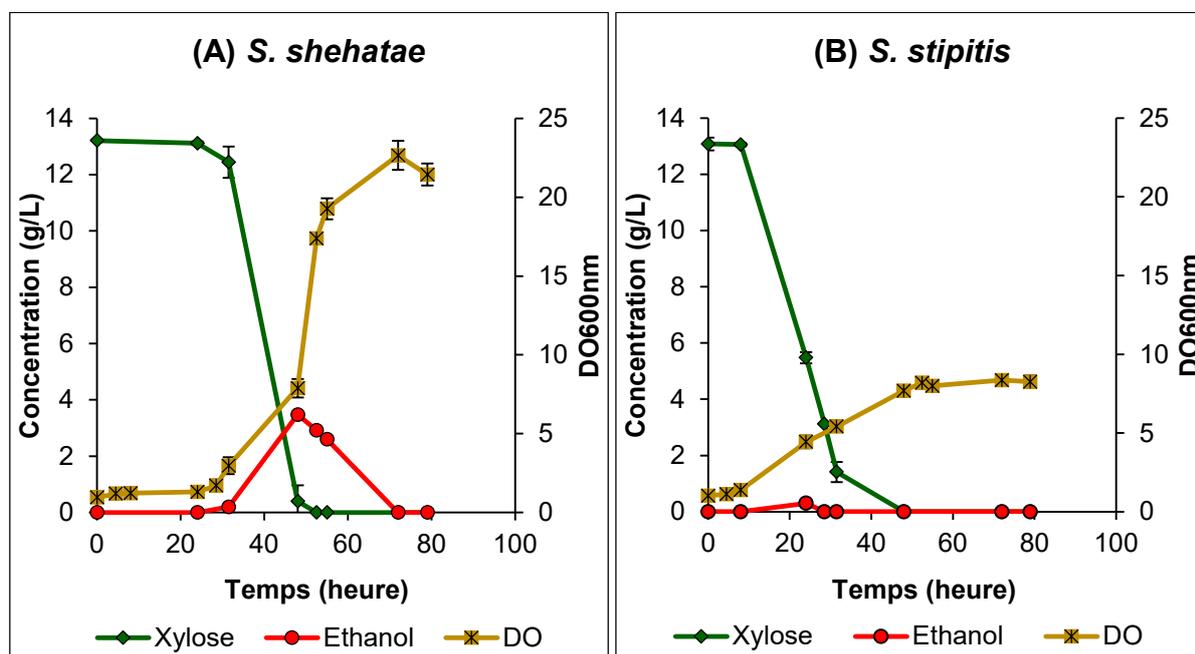
#### **4. Bioconversion du xylane**

Les démarches suivies lors des procédés séquentiels ou simultanés d'hydrolyse enzymatique et de fermentation de la cellulose décrits précédemment sont également appliquées au xylane. L'hydrolyse enzymatique du xylane est réalisée par

les xylanases de *T. longibrachiatum* à 30° C en tampon acétate (50 mM, pH 4,8). Les concentrations finales en substrat et en enzyme dans le milieu réactionnel sont de 20 g/L et 3 mg/mL, respectivement. Seules les souches de *S. shehatae* et *S. stipitis*, capables de fermenter le xylose, ont été étudiées pour la fermentation des hydrolysats enzymatiques du xylane.

#### 4.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF

Le suivi de la croissance et des concentrations du xylose et d'éthanol lors des cultures de *S. shehatae* ou de *S. stipitis* sur les hydrolysats enzymatiques du xylane en SHF est représenté dans la **Figure IV.21**. Tout d'abord, pour la levure *S. shehatae*, les résultats ont montré que la levure croît jusqu'à un maximum de DO de 22,7 après une phase de latence durant environ 28 h (Figure **IV.21 A**). Durant cette phase de latence, la levure synthétise la machinerie cellulaire nécessaire à l'utilisation du xylose (hydrolysat enzymatique du xylane) puisqu'elle poussait sur du glucose lors de la préculture.



**Figure IV.21.** Cinétiques de croissance et concentrations du xylose et de l'éthanol au cours de SHF du xylane obtenues avec *S. shehatae* (A) et *S. stipitis* (B) à 30°C

La consommation du xylose dont la concentration initiale est de 13,2 g/L coïncide avec le début de la phase exponentielle de croissance de la levure (**IV.21 A**). Au bout de 48 h, tout le xylose est consommé et de l'éthanol est produit à un maximum

de 3,5 g/L, ce qui représente un rendement de 29,8% (calculé en fonction de la concentration initiale en xylane). Le rendement éthanolique calculé en fonction de la concentration initiale du xylose (13,2 g/L) est de 51,5%. Et comme pour les cultures précédentes, une fois le xylose totalement consommé, la levure consomme l'éthanol qui devient nul en fin de culture.

Cependant, l'autre levure étudiée, *S. stipitis*, montre un profil différent de celui de *S. shehatae*. En effet, après une phase de latence de 7 h environ, relativement courte par rapport au cas de *S. shehatae* décrit tout en haut, *S. stipitis* atteint un maximum de DO de 8,4 (**Figure IV.21 B**). Sachant que l'inoculum provient également d'une préculture de *S. stipitis* sur le glucose, ce temps de latence plus court pourrait être expliqué par la différence entre les espèces de levures en assimilant les différents substrats (la synthèse des transporteurs, des enzymes etc.).

Concernant la consommation du xylose et la production d'éthanol, on remarque que le xylose partant d'une concentration de 13,1 g/L est complètement consommé en 48 h mais *S. stipitis* produit très peu d'éthanol : 0,3 g/L, soit un rendement de 2,5% en fonction de la concentration en xylane (**Figure IV.21 B**).

Le fait que *S. stipitis* ne produise pas d'éthanol est d'autant plus étrange qu'on a une concentration de xylose de départ de 13,1 g/L et que celle-ci diminue et devient même nulle au bout de 48 heures. De plus, *S. stipitis* n'a pas montré une croissance assez importante qui pourrait éventuellement expliquer cette consommation du xylose sans aucune production d'éthanol. Ceci permet de suggérer qu'il y a production d'autres métabolites intracellulaires à partir du xylose consommé.

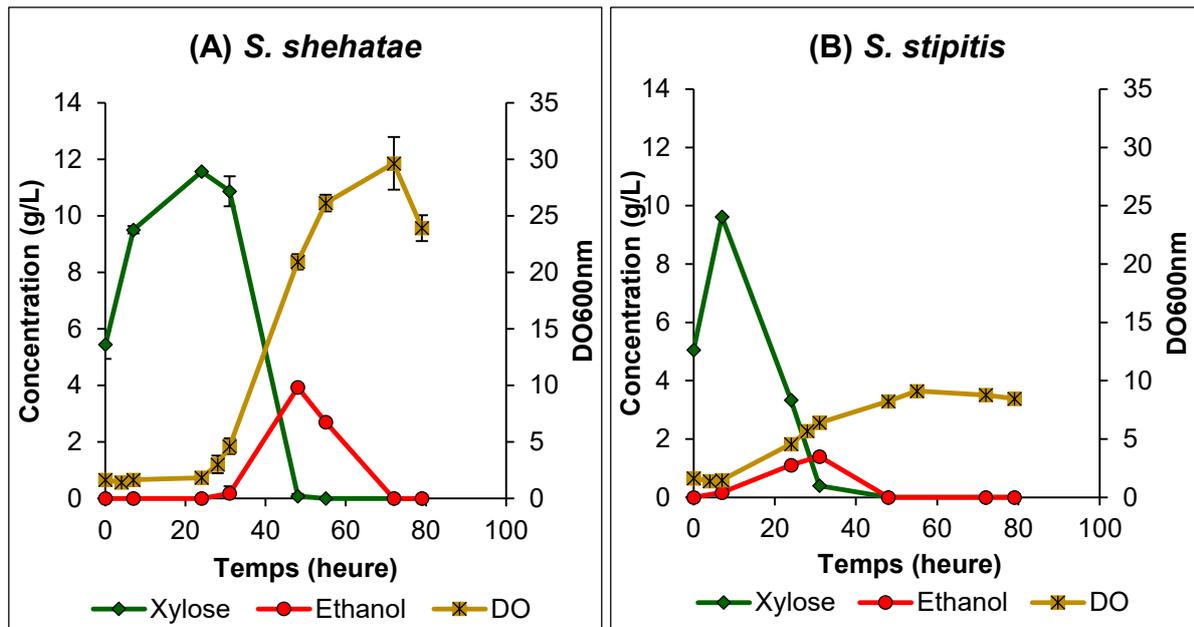
Ainsi, *S. shehatae* produit plus efficacement de l'éthanol que *S. stipitis* à partir de l'hydrolysate du xylane même si les deux souches de levures avaient des rendements similaires en éthanol à partir du xylose pur. Une explication possible pourrait résider dans le fait que le xylose n'est pratiquement jamais obtenu sous forme pure dans les hydrolysats du xylane ou de l'hémicellulose (Teleman *et al.*, 2002). En fait, le xylane de hêtre utilisée dans cette étude est composé de résidus de D-xylose liés entre eux par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4. Ces résidus de xylose sont souvent liés à des groupements latéraux d'acide 4-O-méthylglucuronique en position C-2 et/ou acétylés en position C-2 ou C-3 (Freixo and de Pinho, 2002). Il se peut que la souche de *S. stipitis* n'assimile pas efficacement cette forme de xylose, ce qui se traduit par

une croissance faible et une production d'éthanol quasi nulle. Une autre hypothèse serait attribuée à l'effet des oligosaccharides présents éventuellement dans l'hydrolysat du xylane vu que les endoxylanases agissent aléatoirement au niveau du xylane. Ces produits d'hydrolyse autres que le xylose pourraient probablement exercer un effet inhibiteur sur la souche de *S. stipitis* utilisée dans notre étude. Cependant, la diminution de la concentration du xylose observée pourrait être expliquée dans ce cas par l'importation du xylose vers le milieu intracellulaire par les transporteurs du xylose dont l'affinité n'a pas été affectée.

En revanche, Gupta *et al.* (2009) ont trouvé de bons rendements en éthanol en utilisant une autre souche de *S. stipitis* NCIM 3498 qui produisait 7,13 g/L d'éthanol à partir de 18,24 g/L de sucres de l'hydrolysat hémicellulosique de *Prosopis juliflora*. Ces résultats différents des nôtres peuvent s'expliquer par la différence du substrat et la composition du xylane présent dans *Prosopis juliflora* avec moins d'acide glucuronique ou de groupements acétyles par exemple.

#### **4.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF**

Le procédé simultané combinant les étapes d'hydrolyse et de fermentation a été également testé avec le xylane. Les valeurs de DO et de concentrations en xylose et en éthanol sont représentées en **Figure IV.22 A** pour *S. shehatae* et **B** pour *S. stipitis*.



**Figure IV.22.** Cinétiques de croissance et concentrations du xylose et de l'éthanol au cours de SSF du xylane obtenues avec *S. shehatae* (A) et *S. stipitis* (B) à 30°C

Similairement à la SHF, *S. shehatae* montre une phase de latence plus importante (28 h) que *S. stipitis* (7 h). Ceci est corrélé à une accumulation du xylose plus importante et plus longue observée dans le cas de *S. shehatae*. En effet, la phase exponentielle de croissance de *S. shehatae* débute à partir de 31 h lorsque la concentration du xylose commence à diminuer (**Figure IV.22 A**). D'autre part, la consommation du xylose commence à partir de 7 h avec *S. stipitis*, coïncidant également avec le début de la phase exponentielle de la croissance de la levure (**Figure IV.22 B**).

Cependant, la croissance de *S. shehatae* a été significativement plus importante que celle de *S. stipitis* sur les hydrolysats enzymatiques du xylane aussi bien en SHF qu'en SSF. En effet, une DO maximale de 29,6 a été enregistrée pour *S. shehatae* alors que seulement une valeur de 9,1 a été notée dans le cas de *S. stipitis*. En revanche, la levure *S. stipitis* montrait une croissance très importante sur le xylose pur, se traduisant par une DO maximale de 31,6. Ces résultats décrits dans le chapitre III pourraient donc suggérer que soit *S. stipitis* n'assimile pas efficacement le xylose sous la forme à laquelle il est présent après hydrolyse du xylane (différent du xylose pur), soit la croissance de *S. stipitis* ainsi que la production d'éthanol ont été limitées par des coproduits de l'hydrolyse enzymatique du xylane.

Par ailleurs, on note un maximum d'éthanol de 3,9 g/L (soit un rendement de 33,7%) par *S. shehatae* alors que *S. stipitis* produit 1,4 g/L (12,0%) seulement. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Antunes *et al.* (2014) et Dussán *et al.* (2016) qui ont trouvé un rendement éthanolique plus élevé par *S. shehatae* UFMG HM 52.2 (0,42 g éthanol/g sucre) que par *S. stipitis* NRRL Y-7124 (0,16 g éthanol/g sucre). De plus, le maximum d'éthanol apparaît au moment où la concentration du xylose devient nulle et ceci pour les deux levures évaluées. La concentration de l'éthanol produit diminue après 31 h et 48 h respectivement pour *S. stipitis* et *S. shehatae*. Ce comportement peut être attribué à la consommation totale du xylose présent dans le milieu conduisant à l'assimilation de l'éthanol comme source de carbone. La consommation de l'éthanol après épuisement du xylose a également été constaté par des études précédentes utilisant la levure *S. shehatae* (Chandel *et al.*, 2007 ; Chandel *et al.*, 2013 ; Antunes *et al.*, 2014).

La production d'éthanol est améliorée en SSF par rapport à la SHF pour les deux espèces avec une légère augmentation (d'un facteur de 1,1) de 3,5 à 3,9 g/L dans le cas de *S. shehatae* et une augmentation plus importante (d'un facteur de 4,7) pour *S. stipitis* : de 0,3 à 1,4 g/L. Le xylose libéré par l'action de l'enzyme est plus rapidement consommé par les levures et favorise l'enzyme à en produire davantage en orientant l'équilibre de la réaction vers la formation du xylose. Les meilleurs rendements en éthanol obtenus en SSF pourraient donc être expliqués par la réduction d'inhibition de l'enzyme par son produit qui est le xylose.

Ces résultats mettent en avant la faisabilité et l'efficacité de la méthode simultanée à partir du xylane permettant ainsi d'économiser du temps et de simplifier le procédé en simplifiant les étapes.

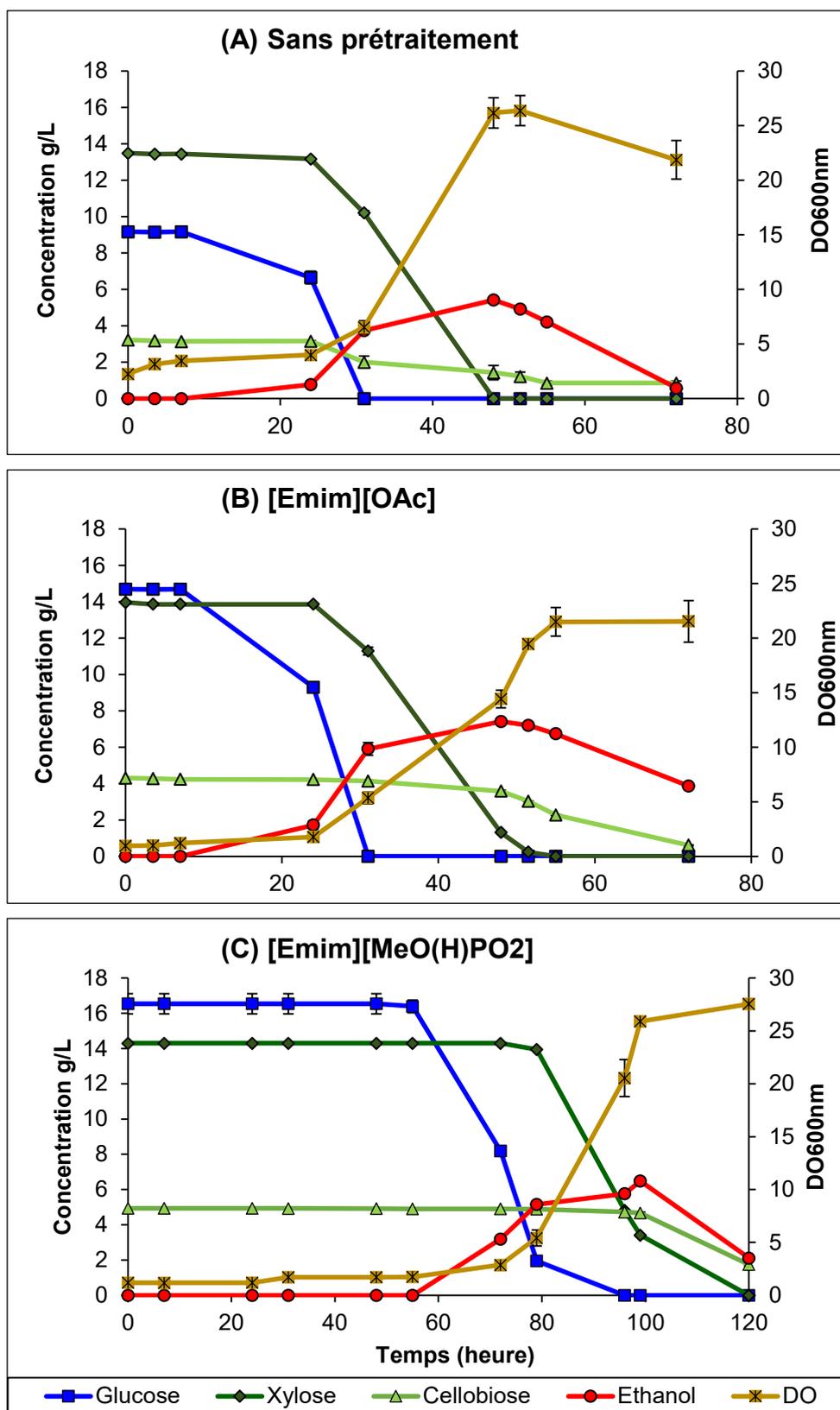
## **5. Bioconversion cellulose & xylane**

Dans ce qui précède, la fermentation des hydrolysats enzymatiques de la cellulose non prétraitée ou prétraitée aux LI par les quatre espèces de levures : *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. shehatae* et *S. stipitis*, a été représentée en premier lieu. Ensuite, les procédés d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique SHF et SSF du xylane ont été abordés en évaluant les deux levures capables de fermenter le xylose : *S. shehatae* et *S. stipitis*.

Suite à ces résultats, la levure *S. shehatae* s'est montrée une candidate intéressante pour la fermentation d'hexoses et du xylose puisqu'elle produit des meilleurs rendements éthanoliques à partir du xylane (SHF : 29,8% et SSF : 33,7%) en comparaison avec *S. stipitis* (SHF : 2,5% et SSF : 12,0%) et aussi à partir de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] (33,5 et 15,2% en SHF et SSF, respectivement contre 26,9 et 3,1% pour *S. stipitis*) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (33,0 et 40,2% en SHF et SSF, respectivement contre 11,1 et 13,5% pour *S. stipitis*). Par conséquent, la levure *S. shehatae* a été sélectionnée pour la fermentation des hydrolysats enzymatiques d'un mélange de cellulose et du xylane. Similairement à chaque polymère seul, les procédés SHF et SSF ont été également évalués dans le cas du mélange des deux polysaccharides : cellulose et xylane.

### **5.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF**

Les hydrolysats enzymatiques de la cellulose prétraitée ou non et du xylane obtenus simultanément par l'action des cellulases de *T. reesei* et des xylanases de *T. longibrachiatum* à 30°C ont été soumis à l'étape de fermentation réalisée par *S. shehatae* à 30°C. L'évolution de la croissance de la levure ainsi que celle de la concentration des sucres et de l'éthanol sont montrées dans la **Figure IV.23**.



**Figure IV.23.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SHF du xylane et de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

Sur les hydrolysats enzymatiques du xylane et de la cellulose non prétraitée la croissance de la levure présente une DO maximale de 26,2 mesurée à 48 h. *S. shehatae* entre en phase exponentielle de croissance après une phase de latence qui a duré environ 24 h. Au départ, la concentration initiale en glucose est de 9,2 g/L et celle du xylose est de 13,5 g/L. Il semble important d'indiquer que la concentration initiale en glucose est plus élevée que celle normalement obtenue après hydrolyse de la cellulose seule par les cellulases. Ceci est dû à la présence des xylanases qui contiennent une activité cellulosique et qui interviennent aussi dans la conversion de la cellulose, comme montré dans la partie précédente. La levure commence à consommer le glucose entre 7 et 24 h jusqu'à devenir nul après 31 h (**Figure IV.23 A**). La consommation du xylose, elle, commence après 24 h et le xylose est épuisé au bout de 48 h. Cette consommation tardive du xylose en présence du glucose dans le milieu a été également constatée par des études précédentes utilisant la levure *S. shehatae* (Du Preez *et al.*, 1986 ; Antunes *et al.*, 2018). Le cellobiose, initialement présent à 3,2 g/L, est consommé progressivement par la levure et sa concentration résiduelle en fin de culture (72 h) est de 0,9 g/L. Le maximum d'éthanol est observé à 48 h après épuisement du glucose et du xylose, avec une valeur de 5,4 g/L. Au-delà de 48 h, la levure consomme l'éthanol produit qui devient nul en fin de culture ce qui en accord avec d'autres travaux (Antunes *et al.*, 2014 ; Antunes *et al.*, 2018). En tenant compte de la concentration initiale en glucose et en xylose, *S. shehatae* produit 0,24 g d'éthanol/g de sucre sur cellulose non prétraitée.

Lorsque la cellulose a été prétraitée à l'[Emim][OAc], la levure croît sur le mélange de polysaccharides après une phase de latence de 24 h (**Figure IV.23 B**), similairement à celle observée sur le mélange de cellulose non prétraitée et du xylane. La croissance de la levure atteint un maximum de DO de 21,5 au bout de 55 h. Cette valeur maximale est proche de celle observée sans prétraitement de la cellulose, ceci permet d'indiquer que la présence de LI résiduel n'a apparemment pas affecté la croissance de la levure.

Cependant, après prétraitement de la cellulose à l'[Emim][OAc], la concentration du glucose initialement présente dans le milieu est de 14,7 g/L, supérieure à celle mesurée sans prétraitement (9,2 g/L) mettant en avant l'effet du prétraitement de la cellulose aux LI. La concentration en xylose est quasiment similaire avec une valeur de 14,7 g/L. La consommation totale du glucose a été notée au temps

31 h alors que le xylose dont la consommation débute dès 24 h, est épuisé à 51 h. De plus, le cellobiose est consommé plus lentement que le glucose ou le xylose et sa concentration en fin de culture est de 0,6 g/L.

La production maximale d'éthanol a été obtenue lorsque les deux sucres sont totalement consommés et atteint une valeur maximale de 7,4 g/L. *S. shehatae* produit un rendement de 0,26 g éthanol/g de sucre, supérieur à celui dans le cas de la cellulose non prétraitée avec du xylane en raison de la concentration en glucose qui est plus importante après prétraitement. En outre, après épuisement du glucose et du xylose, la concentration de l'éthanol diminue progressivement ainsi que celle du cellobiose vu qu'ils ont été consommés par la levure.

Enfin, dans le cas du mélange de xylane et de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], le profil de croissance de *S. shehatae* est différent des deux autres conditions, comme montré dans la **Figure IV.23 C**. En effet, la levure se développe sur ces hydrolysats après une phase de latence plus longue (72 h) que celle observée dans le cas de la cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] (24 h). Durant la période située entre 72 et 99 h, la levure est en pleine phase exponentielle de croissance et atteint un maximum de DO de 25,8, puis sa croissance est ralentie. De plus, la consommation du glucose initialement présent à 16,5 g/L a commencé à 55 h. On note que la levure produit de l'éthanol en même temps qu'elle consomme le glucose qui s'épuise à 96 h. Ensuite, *S. shehatae* consomme le xylose dont la concentration initiale était de 14,3 g/L similairement aux deux autres cas. La production maximale d'éthanol est de 6,5 g/L (0,21 g/g de sucre) et a été observée à 99 h. Au-delà de ce temps, la levure consomme l'éthanol produit ainsi que le cellobiose dont la concentration résiduelle en fin de culture (120 h) est la plus élevée (1,8 g/L) par rapport aux deux autres conditions car l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel provoque une consommation tardive du glucose et du xylose.

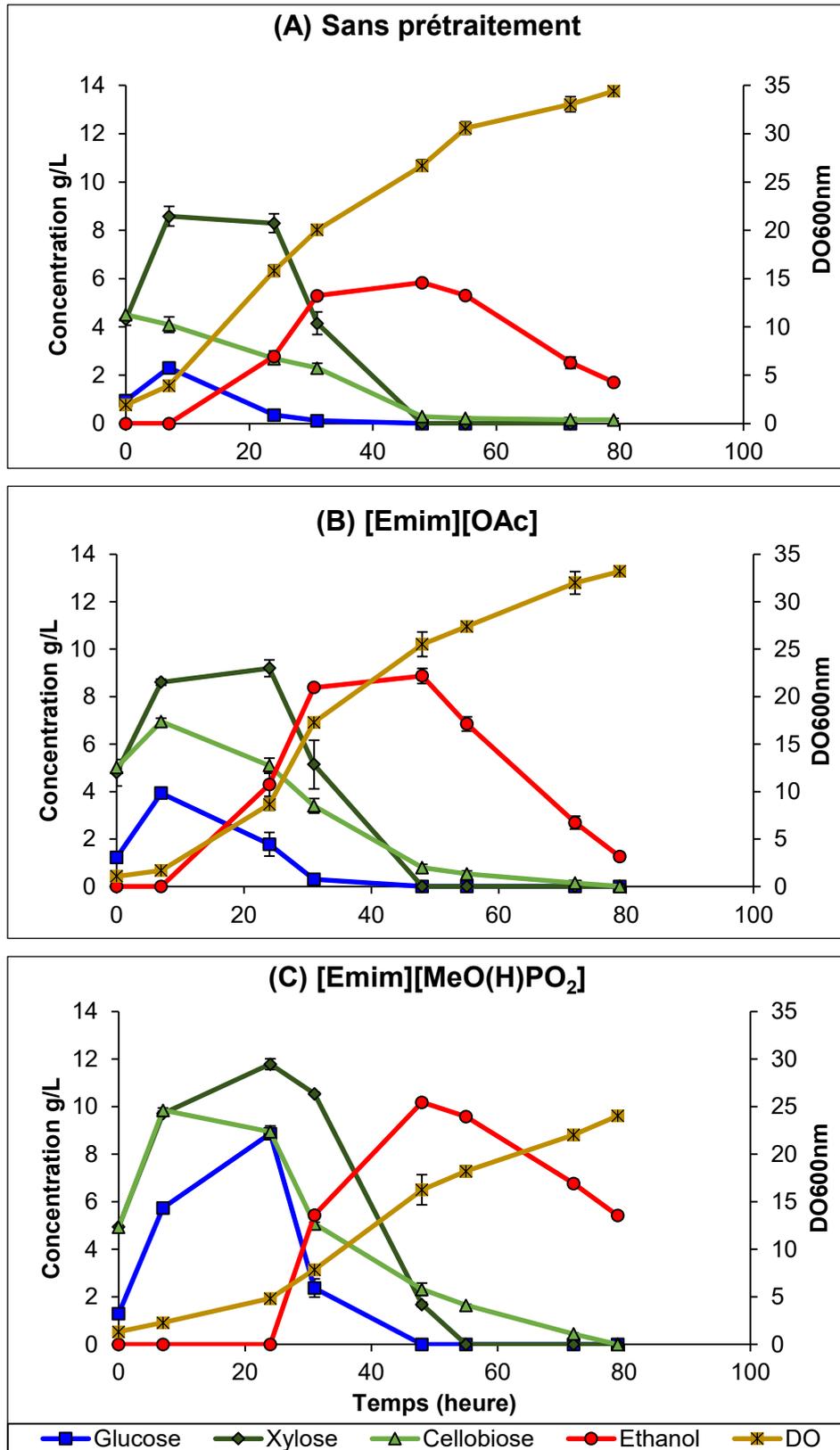
Ces résultats mettent en avant l'effet différent entre l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel qui reste piégé dans la cellulose. L'effet de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] se manifeste notamment par le retardement de la croissance de *S. shehatae* sans l'inhiber avec une légère diminution du rendement éthanolique par rapport à l'[Emim][OAc].

Ces rendements éthanoliques obtenus par *S. shehatae* sur hydrolysats enzymatiques de cellulose et du xylane sont comparables à ceux rapportés par d'autres travaux utilisant des souches différentes de *S. shehatae*. Senatham *et al.* (2016) ont observé que *S. shehatae* 43CS produit un rendement en éthanol de 0,20 g/g à partir de l'hydrolysat de la bagasse de canne à sucre (glucose : 12,2 g/L, xylose : 16,7 g/L) à 30°C et sous conditions limitées en oxygène. De plus, les travaux d'Antunes *et al.* (2014) et de Chandel *et al.* (2013) ont abouti à des rendements éthanoliques proches (0,38 g/g and 0,35 g/g, respectivement) à partir des hydrolysats hémicellulosiques de la bagasse de canne à sucre par la même souche de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

## **5.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF**

La co-hydrolyse de la cellulose moyennes fibres non prétraitée ou prétraitée aux LI et du xylane catalysée respectivement par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* a été réalisée simultanément à la fermentation éthanolique par *S. shehatae* à 30°C. Similairement au procédé SHF, la concentration finale en substrat est également 4% m/v. Cependant, la charge enzyme/substrat est gardée la même dans toutes les expériences : 1 mg/mL de cellulases et 3 mg/mL de xylanases.

La croissance des levures et le dosage des sucres et d'éthanol lors de la SSF du mélange de cellulose et du xylane sont représentés en **Figure IV.24**.



**Figure IV.24.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose, du cellobiose et de l'éthanol au cours de SSF du xylane et de la cellulose non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

Sur le mélange de xylane et de cellulose non prétraitée, la croissance de la levure commence après une phase de latence de 7 h environ et atteint une DO maximale de 34,4 (**Figure IV.24 A**). D'autre part, lorsque la cellulose a été prétraitée à l'[Emim][OAc], *S. shehatae* montre une croissance similaire avec une DO maximale de 33,2 (**Figure IV.24 B**). Cependant, dans le cas du mélange du xylane et de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], le maximum de DO mesuré est de 24,1 (**Figure IV.24 C**), inférieur à celui observé dans les deux autres conditions. Ces observations montrent à nouveau l'effet particulier de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] qui est déjà observé sur cellulose seule. Cependant, en SSF son effet est différent par rapport à la SHF, tout comme pour la cellulose seule, précédemment montrée dans ce chapitre. En effet, en SSF la phase de latence est de 24 h environ (proche de celle du contrôle et de l'[Emim][OAc]) et elle est largement plus courte que celle observée en SHF (72 h). Ceci met en avant l'hypothèse déjà émise sur l'étude réalisée sur les hydrolysats de cellulose seule qui dit que l'effet du LI, notamment l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur la croissance des levures dépend de la concentration en sucres présents dans le milieu.

Quant à la consommation des sucres obtenus au fur et à mesure de l'hydrolyse enzymatique, on note que le glucose issu de la cellulose non prétraitée ou prétraitée à l'[Emim][OAc] est plus rapidement consommé par *S. shehatae* que dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. La concentration du glucose devient nulle après 24 et 31 h dans les deux premiers cas alors qu'elle s'annule après 48 h dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Bien que les concentrations en glucose et en xylose mesurées en SSF représentent la résultante entre l'activité hydrolytique des enzymes et la consommation par les levures, les concentrations en sucres enregistrées dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sont plus élevées que les 2 autres conditions. Ceci permet de suggérer que les sucres sont plus accumulés dans ce cas en raison d'une consommation plus lente par les levures.

Dans le cas du xylose, une accumulation de ce dernier dans le milieu a été remarquée que ce soit avec la cellulose prétraitée ou non avec toutefois une accumulation du xylose plus importante dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ceci pourrait montrer que la présence du glucose dans le milieu réprime l'assimilation du xylose par *S. shehatae*.

De plus, le cellobiose, quant à lui, a sa concentration qui diminue et devient nulle en fin de culture puisqu'il est d'une part hydrolysé en glucose qui sera ensuite consommé par la levure et d'autre part consommé directement par la levure *S. shehatae*.

En fait, l'assimilation du glucose et du xylose aboutit à la croissance de la levure mais aussi à la production d'éthanol. Dans le cas du mélange du xylane et de la cellulose non prétraitée, la concentration maximale en éthanol enregistrée à 48 h était de 5,8 g/L alors que celle obtenue à partir du xylane et de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] était de 8,9 g/L à 48 h. Le prétraitement de la cellulose à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] a conduit à la production d'éthanol la plus élevée (10,2 g/L) malgré la croissance la plus faible. Par conséquent, le prétraitement de la cellulose a permis une amélioration de la concentration maximale en éthanol par *S. shehatae* d'un facteur de 1,5 par l'[Emim][OAc] et 1,8 par l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].

Ainsi, ces résultats ont montré que le procédé SSF conduit à une amélioration de la production d'éthanol par *S. shehatae* à partir du mélange du xylane et de la cellulose prétraitée à l'[Emim][OAc] (d'un facteur de 1,2) et à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (d'un facteur de 1,6) et même non prétraitée (d'un facteur de 1,1). La meilleure augmentation est notée dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] similairement à ce qui a été observé sur cellulose seule. Cette amélioration des rendements éthanoliques réside probablement dans le fait que lors du procédé SSF, l'inhibition des enzymes par leur produit est minimisée vu que les sucres sont consommés au fur et à mesure par les levures, ce qui évite leur accumulation et favorise le déplacement de l'équilibre vers la production de monomères.

## **6. Conclusion partielle**

Tout d'abord, concernant la cellulose, les résultats obtenus, permettent de confirmer l'effet du prétraitement de la cellulose par les LI sur l'augmentation des rendements d'hydrolyse enzymatique par les cellulases. En effet, le prétraitement aux LI est destiné à modifier la structure supramoléculaire de ce polymère cristallin de façon à rendre les cellulases plus accessibles au substrat. Cependant, le point intéressant à mettre en évidence est que la présence de LI résiduel dans la cellulose prétraitée n'a pas conduit à une désactivation majeure des cellulases. Il s'agit effectivement d'un compromis où les LI déstructurent la cellulose et augmentent ainsi

l'accès des cellulases qui sont encore actives bien qu'une partie soit dénaturée par de concentrations résiduelles en LI. De plus, lorsque la cellulose a été prétraitée, les rendements en éthanol étaient plus importants lors de la fermentation éthanolique, peu importe l'espèce de levure utilisée en raison des concentrations plus élevées en glucose. Ces résultats ensemble montrent la faisabilité de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose ainsi que la fermentation par les levures en présence du LI résiduel qui reste piégé dans la cellulose prétraitée. En outre, il est remarquable que l'effet du LI résiduel sur la fermentation microbienne dépend de la nature du LI, dans notre cas de l'anion constitutif du LI, mais dépend aussi de la souche de levure employée.

D'autre part, les études réalisées sur le xylane ont montré que la levure *S. shehatae* produit significativement plus d'éthanol que *S. stipitis* aussi bien en SHF qu'en SSF. Par conséquent, la levure *S. shehatae* constitue une candidate intéressante à prendre en considération en transposant l'étude sur de la biomasse lignocellulosique vu qu'elle a montré de bons rendements en éthanol à partir de la cellulose, du xylane et du mélange des deux.

# Chapitre V

*Application à des biomasses  
lignocellulosiques : influence du  
prétraitement par liquide  
ionique de résidus forestiers et  
agricoles sur la production de  
bioéthanol par des levures*

## 1. Introduction

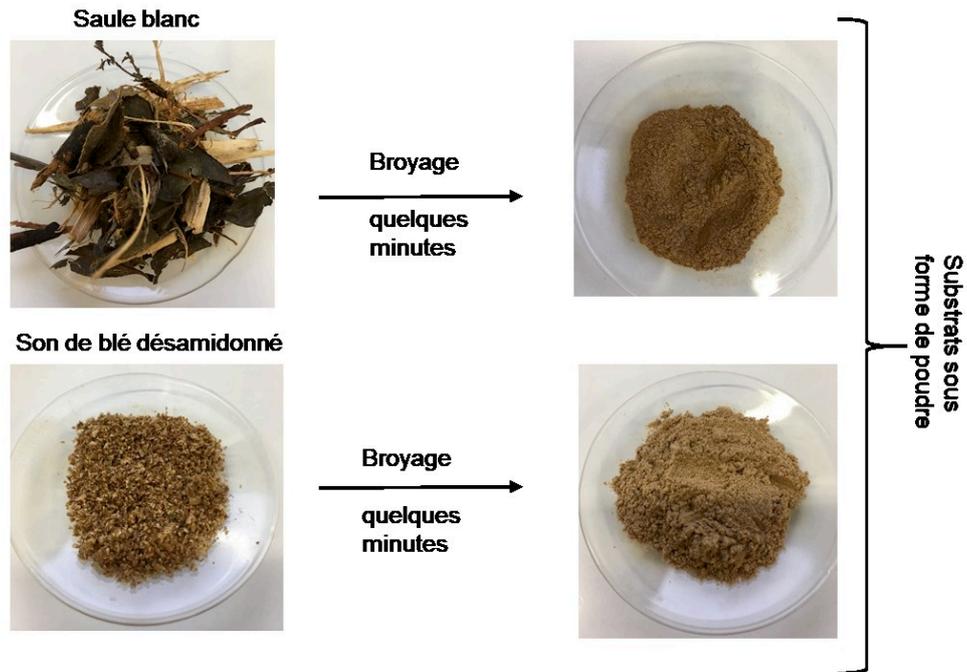
Suite aux études effectuées sur les polymères modèles de cellulose et de xylane présentées en chapitre IV, le modèle d'étude est ensuite appliqué à des BLC réelles. Deux substrats lignocellulosiques distincts par leurs origines et leurs compositions chimiques, ont été sélectionnés : des résidus de saule blanc (*Salix alba*) (résidu forestier ; feuillus) et des échantillons de son de blé désamidonné (résidu agricole ; céréales). Les résidus de saule blanc collectés après élagage sur le site de l'UFR des Sciences de l'UPJV, constituent un déchet forestier sous-exploité, essentiellement comme combustible. Par ailleurs, le son de blé est un coproduit de l'industrie du blé, largement produit et représente une importante source de sucres fermentescibles souvent sous-valorisé (alimentation animale) (Apprich *et al.*, 2014). Ces deux substrats constituent deux exemples de biomasses d'intérêt pour la production de bioéthanol 2G et d'autres produits à haute valeur ajoutée. De plus, le son de blé désamidonné, de par sa composition riche en hémicelluloses, constitue une BLC de choix pour la valorisation de la fraction hémicellulosique en plus de la cellulose en éthanol (Brillouet and Joseleau, 1987 ; Apprich *et al.*, 2014).

Dans ce dernier chapitre, le prétraitement des BLC est effectué par l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (2% m/v) pendant 40 min à 35°C, tout comme pour la cellulose modèle (chapitre IV). Ce couple température – durée a été choisi dans la continuité des études sur la cellulose modèle abordées dans le chapitre précédent, dans le but d'évaluer la faisabilité de minimiser la demande énergétique inhérente au prétraitement par les LI de la BLC, plus complexe que la cellulose modèle. Les substrats lignocellulosiques renferment en plus de la cellulose, des hémicelluloses, des lignines et des extractibles, ce qui empêche l'accessibilité des enzymes aux polysaccharides. Pour ce faire, les échantillons de saule blanc et ceux de son de blé désamidonné non prétraités ou prétraités aux LI sont hydrolysés par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* en tampon acétate (pH 4,8) à 30°C. Ce choix de température a été guidé par la température optimale de fermentation éthanolique par les levures en vue de combiner les étapes. La concentration finale en substrat de 2% m/v en tampon acétate, ainsi que les concentrations finales respectives de 1 g/L et 3 g/L en cellulases et en xylanases ont été conservés sur l'ensemble des hydrolyses enzymatiques effectuées dans ce chapitre.

Ensuite, en se basant sur les résultats obtenus sur monosaccharides et polymères modèles, les deux espèces de levures les plus performantes en terme de production d'éthanol : *Saccharomyces cerevisiae* et *Scheffersomyces shehatae* ont été retenues pour la fermentation des hydrolysats enzymatiques du saule blanc et du son de blé désamidonné à 30°C. La levure *S. cerevisiae* produit des rendements éthanoliques élevés uniquement à partir d'hexoses alors que *S. shehatae* est capable de fermenter à la fois les hexoses et le xylose et semble ainsi intéressante pour la valorisation des fractions cellulosique et hémicellulosique en bioéthanol 2G. Cette étude a également comme objectif d'évaluer l'influence du LI résiduel (de l'ordre de 0,1 à 10% m/m) (Husson *et al.*, 2011) qui reste piégé dans la BLC prétraitée même après lavage intensif, sur la croissance des levures et aussi sur leur performance de production d'éthanol. Enfin, l'effet de combiner les étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique sur la production d'éthanol, selon un procédé simultané : *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) est étudié et comparé au procédé séquentiel : *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF), pour le saule blanc et également pour le son de blé désamidonné.

## **2. Composition des substrats lignocellulosiques**

Les échantillons lignocellulosiques de saule blanc (*Salix alba*) ou de son de blé désamidonné lyophilisés ont été broyés à l'aide d'un broyeur vibrant à billes afin d'obtenir des particules sous formes de poudre fine comme le montre la **Figure V.1**.



**Figure V.1.** Echantillons de saule blanc et de son de blé désamidonné avant (à gauche) et après (à droite) broyage par le broyeur vibrant à billes (RETSCH MM400) pendant quelques minutes

La lyophilisation et le broyage des échantillons lignocellulosiques ont été effectués avant de réaliser la détermination de la composition, le prétraitement aux LI ou l'hydrolyse enzymatique.

La composition des échantillons de saule blanc et ceux de son de blé désamidonné a été déterminée par la méthode de Van Soest avant et après prétraitement aux LI (Van Soest, 1963 ; Van Soest *et al.*, 1991) et présentée dans le **Tableau V.1.**

**Tableau V.1.** Composition relative (déterminée en pourcentage des résidus) des échantillons de saule blanc et de son de blé désamidonné avant et après prétraitement à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] 40 min à 35°C

BLC	Récupération de la BLC (% m/m) <sup>a</sup>	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine
Saule blanc	100	40,7 ± 2,4	15,1 ± 2,3	18,2 ± 3,3
Saule blanc [Emim][OAc]	79,6 ± 4,9	48,9 ± 0,1	18,9 ± 7,8	20,0 ± 2,9
Saule blanc [Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	79,4 ± 2,5	48,8 ± 1,4	15,5 ± 2,8	21,8 ± 0,8
Son de blé désamidonné	100	21,1 ± 3,3	40,9 ± 4,5	12,6 ± 4,1
Son de blé désamidonné [Emim][OAc]	76,8 ± 1,8	28,7 ± 1,2	44,9 ± 3,7	10,2 ± 0,8
Son de blé désamidonné [Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	77,6 ± 1,9	20,9 ± 2,4	49,2 ± 2,7	9,7 ± 2,2

a : Matières sèches

A la lumière des valeurs présentées dans le **Tableau V.1**, les échantillons de saule blanc contiennent plus de cellulose (40,7%) que ceux de son de blé désamidonné (21,1%). A contrario, la teneur en hémicelluloses est plus importante dans le son de blé désamidonné (40,9%) que dans le saule blanc (15,1%). Quant à la lignine, sa teneur est plus élevée dans le saule blanc (18,2%) que dans le son de blé désamidonné (12,6%). Cette observation est en concordance avec la littérature étant donné que la teneur en lignine est typiquement plus élevée dans les biomasses forestières que dans les résidus agricoles (Mosier *et al.*, 2005 ; Prasad *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2012 ; Saini *et al.*, 2015 ; Tye *et al.*, 2016). De même, les résultats sur la composition du saule (feuillus) obtenus sont cohérents avec les travaux de Sassner *et al.* (2008) sur le saule mais également avec la composition typique des bois de feuillus (Shafiei *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012 ; Auxenfans *et al.*, 2014a ; Saini *et al.*, 2015). Il a été rapporté que la fraction hémicellulosique du saule est composée majoritairement de xylane sous forme de O-acétyl-(4-O-méthylglucurono)xylane (Teleman *et al.*, 2002

; Sassner *et al.*, 2008). Pour le son de blé désamidonné, la fraction hémicellulosique constitue la fraction prédominante des polysaccharides, ce qui a déjà été rapporté dans d'autres études (Bataillon *et al.*, 1998 ; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005 ; Apprich *et al.*, 2014). De plus, l'arabinoxylane (chaîne principale formée de résidus de xylose liés en  $\beta$ -1,4, le plus souvent substitués par des résidus de  $\alpha$ -L-arabinose en position C(O)-2 ou C(O)-3 ou les deux) constitue la fraction majoritaire des hémicelluloses du son de blé (Brillouet and Joseleau, 1987 ; Apprich *et al.*, 2014 ; Prückler *et al.*, 2014).

Pour le saule blanc, à part l'augmentation de la fraction cellulosique de 40,7% à 48,9 et 48,8% pour l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] respectivement, la teneur en lignines est quasiment similaire pour les trois conditions : 18,2, 20,0 et 21,8%, respectivement. Ceci met en évidence l'absence de délignification après prétraitement du saule blanc aux deux LI à 35°C pendant 40 min. De même, pour les hémicelluloses, aucune modification significative de leur teneur n'a été remarquée.

Par ailleurs, dans le cas de son de blé désamidonné, une augmentation de la teneur en hémicelluloses de 40,9 à 44,9 et 49,2% a été constatée, respectivement pour l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], avec une augmentation de la teneur en cellulose de 21,1% à 28,7% uniquement dans le cas de l'[Emim][OAc]. En outre, les deux LI ne sembleraient pas affecter la teneur en lignines ni dans le son de blé désamidonné, ni dans le saule blanc.

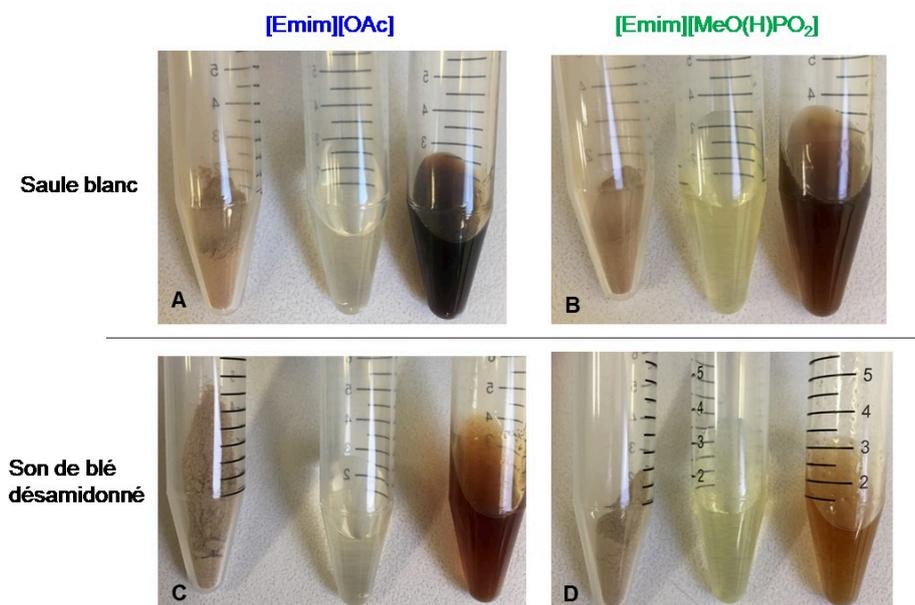
D'après les valeurs (et les écarts types) présentées dans le **Tableau V.1**, il est remarqué qu'il n'y a pas de modification majeure des proportions relatives de chacun de trois polymères après prétraitement aux LI. Cette observation confirme que le prétraitement aux LI à basses températures permettrait une meilleure récupération des trois polymères principaux constitutifs de la lignocellulose (Labbé *et al.*, 2012 ; Moyer *et al.*, 2018), contrairement aux températures élevées qui entraînent une délignification, et/ou une élimination des hémicelluloses et/ou une dégradation des polysaccharides (Lee *et al.*, 2009 ; Miyafuji *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2009 ; Arora *et al.*, 2010).

Toutefois, après prétraitement aux LI ([Emim][OAc] ou [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]) pendant 40 min à 35°C, la récupération de la biomasse est d'environ 79% pour le saule blanc et 77% pour le son de blé désamidonné, quel que soit le LI, même si la délignification n'est pas significative (**Tableau V.1**). Ceci indique que les deux LI

utilisés induisent une déconstruction et un fractionnement des échantillons de saule blanc et de son de blé désamidonné. Cette différence de masse observée est probablement attribuée à la dissolution des substances extractibles telles les lipides, les protéines, les tanins, les flavonoïdes, l'amidon résiduel et autres composés aromatiques dans les LI. En effet, il a été rapporté que la teneur en protéines et en lipides dans le son de blé désamidonné est respectivement entre 15 – 20% et 4 – 6% (Bataillon *et al.*, 1998 ; Maes and Delcour, 2001 ; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2010b ; Apprich *et al.*, 2014), alors que la teneur en extractibles dans le saule a été estimée à plus de 10% (Sassner *et al.*, 2008).

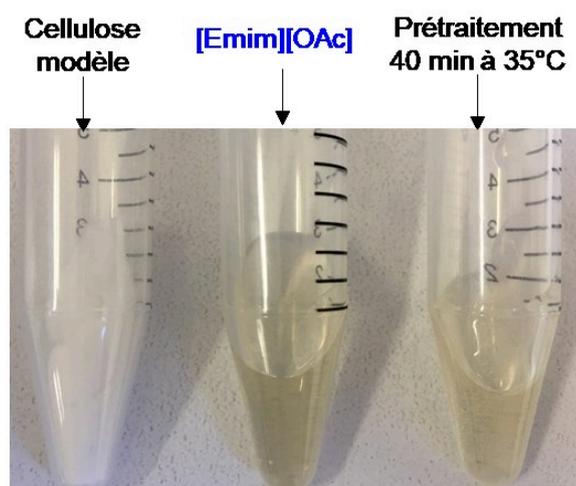
### 3. Solubilisation des substrats lignocellulosiques dans les liquides ioniques

Les échantillons de saule blanc et de son de blé désamidonné ont été soumis au prétraitement par l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] durant 40 minutes à 35°C, avec une charge en BLC de 2% m/v. Sous ces conditions expérimentales, les deux LI, l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], ont été capables de solubiliser les deux substrats lignocellulosiques testés comme pour la cellulose modèle (du coton) conduisant à des solutions homogènes (**Figure V.2**).



**Figure V.2.** Echantillons de BLC avant et après prétraitement à l'[Emim][OAc] (**A**) Saule et (**C**) Son du blé ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**B**) Saule et (**D**) Son de blé. De gauche à droite : BLC avant prétraitement, LI et BLC après prétraitement par le LI durant 40 min à 35°C

D'après la **Figure V.2**, il est remarquable que la couleur des solutions de BLC obtenues après incubation avec le LI pendant 40 min à 35°C varie entre les deux BLC : saule et son de blé mais également selon le LI utilisé. Les deux BLC montrent des solutions foncées après incubation dans le LI alors que la solution de la cellulose modèle moyennes fibres dans les deux LI présente un aspect transparent clair (**Figure V.3**).



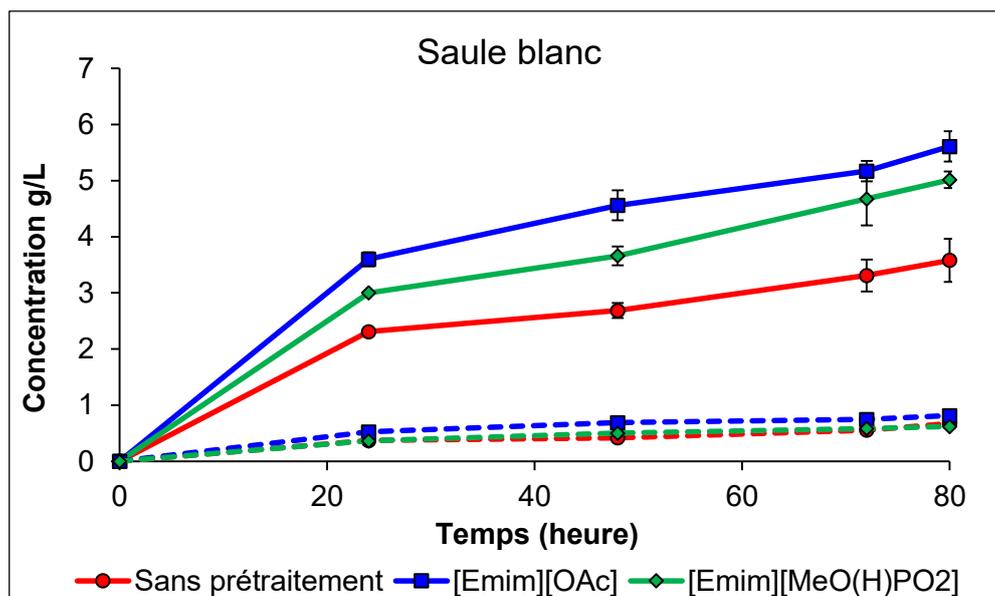
**Figure V.3.** Cellulose modèle moyennes fibres (du coton) avant (à gauche) et après prétraitement à l'[Emim][OAc] (à droite) durant 40 min à 35°C

Alors que la cellulose modèle n'a pas conduit à un changement de la couleur du LI qui reste jaune pâle, le saule blanc et le son de blé désamidonné ont l'assombri, ce qui pourrait être attribué à la présence d'autres constituants dans les BLC notamment des lignines, des polyphénols (tanins et flavonoïdes) et autres composés aromatiques (phénylpropanoïdes et divers précurseurs aromatiques) (Kilpeläinen *et al.*, 2007 ; Zavrel *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'intensité de la couleur des solutions de BLC dans les LI est dépendante de la BLC et également du LI. En effet, les solutions de BLC dans l'[Emim][OAc] sont plus foncées que dans l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ce qui pourrait être expliqué par la différence de capacité de ces deux LI à solubiliser les constituants de la BLC. Toutefois, le saule blanc mène à des couleurs plus intenses que le son de blé désamidonné ce qui peut être dû à la teneur en lignines plus élevée dans le saule blanc (18,2%) que dans le son de blé désamidonné (12,6%) (**Tableau V.1**). Cette observation est cohérente avec l'étude de Ajao *et al.* (2018) qui ont indiqué que la couleur des lignines en solution peut varier du jaune au marron foncé en fonction de son origine (biomasses forestières ou agricoles).

D'autre part, la viscosité des solutions est variable selon la teneur en cellulose dans la biomasse : la solution de la cellulose modèle dans les LI est hautement visqueuse, plus que celle de saule blanc (40,7%), et la solution de son de blé désamidonné qui contient la plus faible teneur en cellulose (21,1%) est la moins visqueuse.

#### 4. Hydrolyse enzymatique des substrats lignocellulosiques

L'hydrolyse enzymatique des échantillons de saule et ceux de son de blé désamidonné non traités ou prétraités à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (avec une concentration initiale de 20 g/L) a été effectuée par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* à 30°C. Afin de comparer les deux BLC avant et après prétraitement aux LI à 35°C, les concentrations en glucose et en xylose lors de l'hydrolyse enzymatique (80 h) du saule et du son de blé ont été suivies (**Figure V.4** et **Figure V.5**).

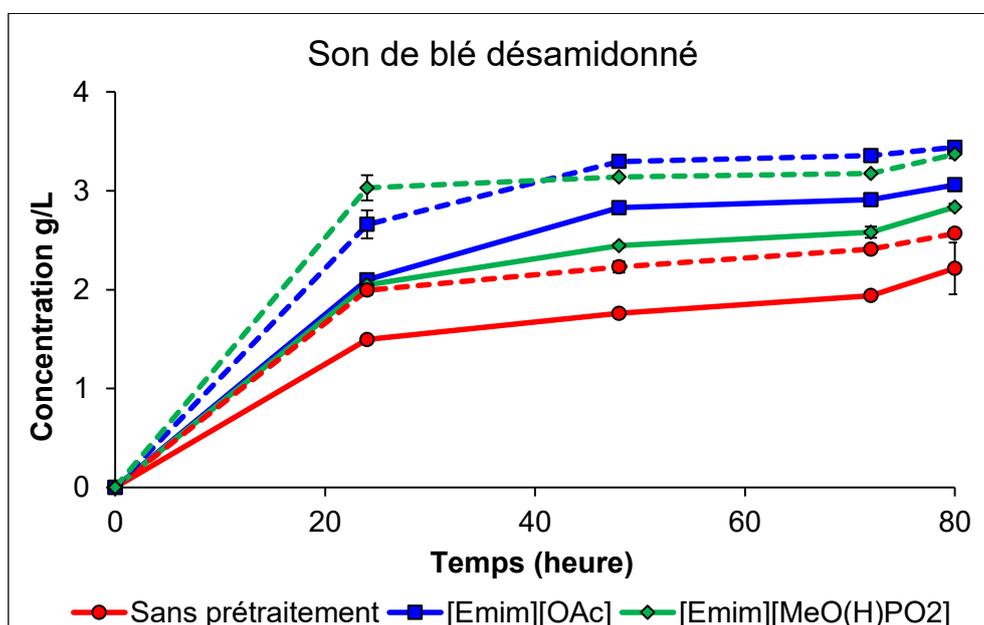


**Figure V.4.** Concentrations du glucose (lignes pleines) et du xylose (lignes pointillées) obtenues lors de l'hydrolyse enzymatique à 30°C par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* des échantillons de saule blanc avant ou après prétraitement à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] à 35°C pendant 40 min

D'après la **Figure V.4**, l'hydrolyse enzymatique des échantillons du saule non prétraités montre une libération progressive du glucose conduisant à une concentration de 3,6 g/L à 80 h. Bien que le prétraitement des échantillons de saule par l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] conduit à une production de glucose dont

l'allure de la courbe est similaire à celle obtenue sans prétraitement, les concentrations du glucose à 80 h sont plus élevées : 5,6 et 5,0 g/L, respectivement. En tenant compte de la teneur en cellulose dans le saule, les rendements en glucose obtenus après 80 h d'hydrolyse enzymatique des échantillons de saule non prétraités et prétraités par l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sont respectivement de 39,6, 62,0 et 55,4%. Ainsi, les rendements en glucose sont multipliés d'un facteur de 1,6 et 1,4 après prétraitement à l'[Emim][OAc] et à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement comparés au contrôle sans prétraitement. En revanche, l'hydrolyse enzymatique du saule blanc a conduit à une faible production de xylose (entre 0,6 et 0,8 g/L à 80 h) à partir des échantillons non traités ou prétraités aux LI. Ces faibles concentrations en xylose obtenues sont dues à la faible teneur initiale en hémicelluloses qui sont principalement constituées de xylane.

L'hydrolyse enzymatique du son de blé désamidonné génère des concentrations du xylose plus importantes que celles du glucose quelle que soit la condition (sans ou avec prétraitement aux LI) (**Figure V.5**), ce qui est expliqué par la teneur plus élevée en hémicelluloses qu'en cellulose dans le son de blé désamidonné (**Tableau V.1**).



**Figure V.5.** Concentrations du glucose (lignes pleines) et du xylose (lignes pointillées) obtenues lors de l'hydrolyse enzymatique à 30°C par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* des échantillons du son de blé désamidonné avant ou après prétraitement à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] à 35°C pendant 40 min

Sans prétraitement, les concentrations en glucose et en xylose obtenues après 80 h d'hydrolyse enzymatique sont respectivement, 2,2 et 2,6 g/L, correspondant à un rendement de 47,2% en glucose et 27,6% en xylose (en tenant compte de la teneur en cellulose et en hémicelluloses). Après prétraitement du son de blé désamidonné à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], une augmentation de la concentration en glucose à 80 h a été notée jusqu'à 3,1 (65,3%) et 2,8 (60,5%) et également de celle en xylose jusqu'à 3,4 (37,0%) et 3,4 g/L (36,3%), respectivement. Le prétraitement à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] a permis une augmentation des concentrations en glucose respectivement, d'un facteur de 1,4 et 1,3. De même, les concentrations en xylose à 80 h ont été multipliées d'un facteur de 1,3 après prétraitement du son de blé désamidonné par l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement.

L'impact du prétraitement sur l'amélioration des rendements d'hydrolyse enzymatique est quasiment similaire pour le saule blanc et le son de blé désamidonné, malgré la différence de la nature et de la composition chimique entre les deux BLC. De plus, il est remarquable qu'il n'y a pas une différence significative entre l'impact des deux LI : l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur l'amélioration des rendements d'hydrolyse enzymatique des deux BLC (d'un facteur de 1,6 et 1,4 pour le saule blanc, et 1,4 et 1,3 pour le son de blé désamidonné, respectivement). Ceci indique que le prétraitement par les LI, même à des basses températures (35°C), permet d'augmenter l'accessibilité des enzymes hydrolytiques aux fractions hydrolysables. De plus, ces résultats montrent que les enzymes sont encore actives bien qu'une partie peut être dénaturée par la présence de LI résiduel piégé dans la BLC prétraitée. Ceci est expliqué par un compromis entre une accessibilité améliorée des enzymes aux fractions hydrolysables après prétraitement aux LI (en déstructurant la BLC via la rupture des liaisons hydrogène) et une désactivation réduite par le LI résiduel (par le même mécanisme de perturbation de liaisons hydrogène), conformément à l'étude de Auxenfans *et al.* (2017).

Toutefois, il est à indiquer que les rendements d'hydrolyse enzymatique sont directement liés aux conditions expérimentales : la nature de la BLC, la teneur en cellulose ou en hémicelluloses, la charge en substrat, la nature du LI, la température et la durée de prétraitement, l'origine des enzymes et la température de l'hydrolyse enzymatique (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010 ; Husson *et al.*, 2011 ; Auxenfans *et al.*,

2014a ; Badgujar and Bhanage, 2015 ; Cao *et al.*, 2017). En comparant nos résultats avec la littérature, le prétraitement aux LI à 35°C conduit à des rendements en glucose inférieurs à ceux obtenus à des températures plus élevées classiquement appliquées lors du prétraitement de la BLC (entre 110 et 160°C). Certains auteurs ont rapporté des performances enzymatiques élevées après prétraitement à l'[Emim][OAc] (3 h à 160°C) aboutissant à des rendements en glucose de 98,2% à partir de la bagasse de canne à sucre (résidu agricole), de 96,0% à partir de *switchgrass* (biomasses herbacées) (Li *et al.*, 2010), ou de 79,1% et 73,3% à partir de chêne (feuillus) et d'épicéa (résineux), respectivement (40 min à 110°C) (Auxenfans *et al.*, 2014b).

Par ailleurs, dans l'optique de fractionner la BLC dans des conditions douces et respectueuses de l'environnement tout en récupérant les trois polymères principaux sans dégradation, ces rendements acceptables permettent d'envisager un procédé « one-pot » où le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanoliques sont combinés.

## **5. Fermentation des hydrolysats enzymatiques des substrats lignocellulosiques par les levures**

Pour l'étape de fermentation éthanolique, deux options ont été étudiées : soit elle est effectuée séquentiellement à l'hydrolyse enzymatique selon un procédé séparé ou séquentiel, Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF), soit la fermentation éthanolique et l'hydrolyse enzymatique sont effectuées simultanément selon un procédé simultané, Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF).

Deux espèces de levures *S. cerevisiae* et *S. shehatae* ont été sélectionnées pour la fermentation éthanolique des hydrolysats enzymatiques de saule blanc et de son de blé désamidonné et ceci en se basant sur nos résultats des chapitres III et IV sur monosaccharides et polymères modèles.

### **5.1. Procédé séquentiel d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SHF**

L'hydrolyse enzymatique des échantillons de saule blanc ou de son de blé désamidonné non prétraités ou prétraités à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (40 min à 35°C) est réalisée par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* à 30°C en tampon acétate (pH 4,8) (2% m/v). Après 80 h d'hydrolyse

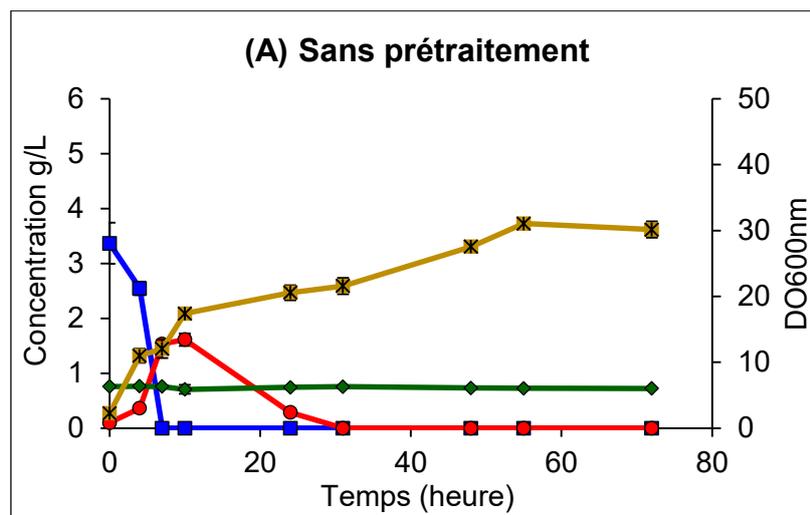
enzymatique, les milieux réactionnels sont autoclavés permettant d'inactiver les enzymes et de stériliser les milieux avant l'inoculation des levures. Les hydrolysats enzymatiques du saule blanc renfermant principalement du glucose et ceux du son de blé désamidonné qui contiennent à la fois du glucose et du xylose seront fermentés, après ajout du milieu Yeast-Malt (YM) concentré (extrait de malt, extrait de levure et peptone), par *S. cerevisiae* ou *S. shehatae* à 30°C, en présence du LI résiduel depuis l'étape de prétraitement. Il est à noter que les sucres libérés suite à l'hydrolyse enzymatique représentent la seule source carbonée éthanologénique présente dans le milieu de culture (Mehmood *et al.*, 2015).

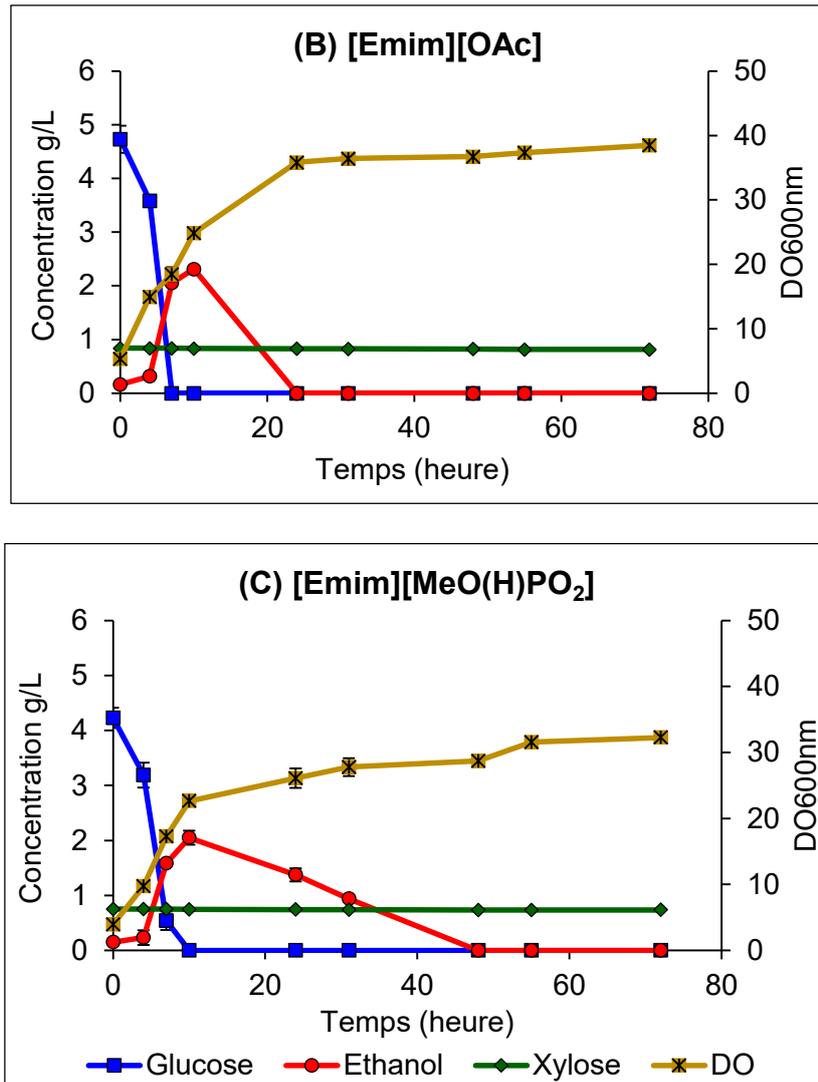
### 5.1.1. Saule blanc

#### 5.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Les cultures de *S. cerevisiae* sur les hydrolysats enzymatiques de saule avec ou sans prétraitement ont été évaluées en suivant les paramètres suivants : la croissance des levures en mesurant la DO<sub>600nm</sub>, la consommation des sucres et la production d'éthanol par HPLC (**Figure V.6**).

Toutes les croissances de *S. cerevisiae* sur les hydrolysats enzymatiques des échantillons de saule blanc non prétraité ou prétraité à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ont montré une cinétique de croissance microbienne classique avec une phase de croissance et une phase stationnaire.





**Figure V.6.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SHF du saule blanc non prétraité (A) et prétraité à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. cerevisiae* à 30°C

En absence de prétraitement, la levure *S. cerevisiae* se développe bien sur les hydrolysats enzymatiques de saule atteignant une DO maximale de 31,1 à 55 h. Cette DO maximale observée est supérieure à celle obtenue précédemment sur cellulose modèle non prétraitée (20,5 dans le chapitre IV) ou même sur glucose à 20 g/L (14,5 dans le chapitre III). Cependant, il est à indiquer qu'en étudiant les substrats lignocellulosiques, les milieux sont troubles et les mesures de DO ne sont peut-être pas assez fiables, mais elles permettent quand même de suivre l'évolution de la croissance des levures. Dans le cas des hydrolysats enzymatiques du saule blanc préalablement prétraité à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], les DO maximales atteintes sont de 38,5 et 32,3 à 72 h, respectivement. Ces DO maximales supérieures

au contrôle sans prétraitement indiquent que le LI résiduel piégé dans le saule blanc prétraité a peu d'effet sur la croissance de la levure *S. cerevisiae*. De plus, la croissance des levures est plus importante sur les substrats prétraités étant donné que les concentrations initiales en glucose sont plus élevées. Ces résultats observés sur les hydrolysats enzymatiques du saule blanc sont pourtant différents de ceux observés précédemment sur les hydrolysats enzymatiques de la cellulose modèle où l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] montrait un effet inhibiteur important sur la croissance de *S. cerevisiae*. En effet, la croissance de *S. cerevisiae* sur les hydrolysats enzymatiques de la cellulose prétraitée à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] était faible (DO maximale 4,5 contre 20,5 sans prétraitement), or ce n'est pas le cas ici sur les hydrolysats enzymatiques du saule blanc. Ceci suggère que l'interaction LI – substrat dépend du LI mais également du substrat étudié. Dans le cas de la cellulose modèle, il semblerait que l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] établisse des interactions plus fortes avec la cellulose entraînant une teneur plus élevée en LI résiduel ce qui affecterait ensuite davantage la croissance des levures.

Les concentrations initiales en glucose (**Figure V.6**) sont de 3,4 g/L pour le contrôle sans prétraitement et 4,7 et 4,2 g/L dans le cas de prétraitement à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Dans toutes les conditions expérimentales, la totalité du glucose présent dans le milieu de culture a été consommé par les levures entre 7 et 10 h alors que la concentration du xylose, se situant entre 0,7 et 0,8 g/L, reste constante tout au long des cultures. Par conséquent, le xylose n'est pas consommé par *S. cerevisiae*, confirmant nos études dans le chapitre III sur le xylose pur et également la littérature (Bai *et al.*, 2008 ; Gírio *et al.*, 2010 ; Balat, 2011). Sur les substrats non prétraités ou prétraités au LI, les levures produisent de l'éthanol tant que le glucose est présent dans le milieu, jusqu'à atteindre un maximum au moment où le glucose est épuisé. Le maximum d'éthanol produit est proportionnel à la concentration initiale en glucose : 1,6 g/L pour le contrôle, et 2,3 et 2,1 g/L après prétraitement du saule à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Dès que le glucose est épuisé, la concentration en éthanol diminue en raison de sa consommation par les levures jusqu'à devenir nulle, confirmant la littérature (Chandel *et al.*, 2007 ; Antunes *et al.*, 2014 ; Mehmood *et al.*, 2015 ; Mehmood *et al.*, 2018). De plus, cette consommation d'éthanol est accompagnée par une augmentation de la croissance des levures (**Figure V.6**). Les rendements

éthanoliques peuvent être calculés soit en considérant la concentration initiale en glucose présente dans le milieu, soit en considérant la concentration initiale de BLC en tenant compte du pourcentage de cellulose constitutive (**Tableau V.2**).

**Tableau V.2.** Rendements maximaux en éthanol obtenus lors des cultures de *S. cerevisiae* à 30°C sur les hydrolysats enzymatiques du saule blanc sans et avec prétraitement à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] 40 min à 35°C

Condition	Y <sub>éthanol</sub> maximal (%)	
	/[Cellulose] <sub>BLC</sub> <sup>a</sup>	/[Glucose] <sub>initial</sub> <sup>b</sup>
Sans prétraitement	34,9 ± 1,1%	93,9 ± 2,9%
[Emim][OAc]	50,1 ± 1,4%	95,7 ± 2,6%
[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	44,4 ± 2,8%	94,8 ± 5,9%

<sup>a</sup> à partir de la concentration initiale en BLC (20 g/L) en tenant compte de la teneur en cellulose constitutive

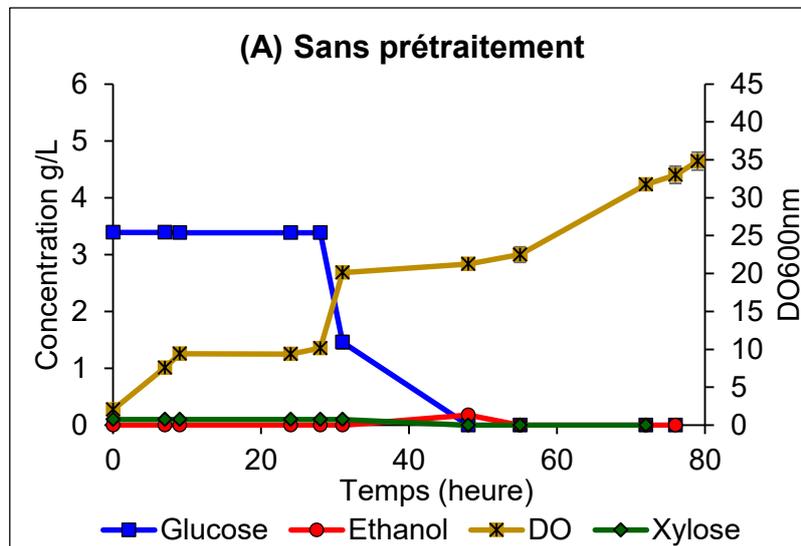
<sup>b</sup> à partir de la concentration initiale du glucose présente dans le milieu de culture

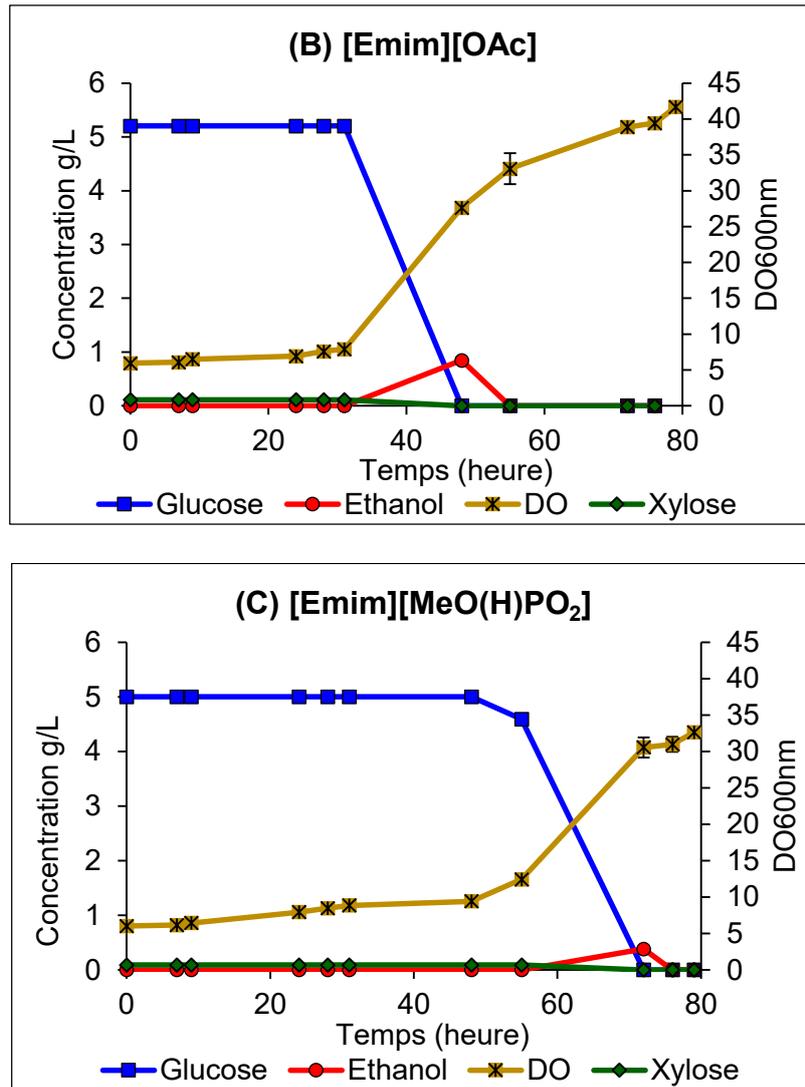
Si on considère les rendements calculés à partir de la BLC, il est remarquable que le prétraitement du saule à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] conduit à une augmentation des rendements, respectivement d'un facteur de 1,4 et 1,3 par rapport au contrôle sans prétraitement. Cette amélioration de la production d'éthanol par *S. cerevisiae* est expliquée par les concentrations initiales en glucose plus élevées après prétraitement du saule aux LI. Par ailleurs, les hauts rendements éthanoliques calculés en fonction de la concentration initiale en glucose mettent en évidence que la présence de LI résiduel dans la BLC prétraitée ne diminue pas la capacité fermentaire de *S. cerevisiae*. De même, ces résultats permettent de constater que la production d'éthanol par *S. cerevisiae* n'a pas non plus été affectée par la présence des autres constituants du saule blanc tels que les lignines, les hémicelluloses, les extractibles ou par des coproduits dérivés du prétraitement ou de l'hydrolyse enzymatique, similairement à une étude précédente (Mehmood *et al.*, 2018). En revanche, selon certaines études, ces composés peuvent parfois limiter la fermentation des levures (Binder and Raines, 2010 ; Sitepu *et al.*, 2014 ; Soudham *et al.*, 2015 ; Dickinson *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2016a).

Enfin, les rendements très élevés observés avec *S. cerevisiae* sur les hydrolysats de saule blanc non traités (93,9%) ou prétraités à l'[Emim][OAc] (95,7%) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (94,8%) confirment les caractéristiques de cette levure largement évoqués dans la littérature (Van Dijken and Scheffers, 1986 ; Flores *et al.*, 2000).

**5.1.1.2. *Scheffersomyces shehatae***

Les cultures sur hydrolysats enzymatiques de saule non prétraité ou prétraité aux LI ont également été effectuées avec la levure *S. shehatae* qui présente la capacité de fermenter les hexoses et le xylose. Les résultats obtenus avec cette levure diffèrent de ceux de *S. cerevisiae* et sont présentés en **Figure V.7**. En début de culture sur les hydrolysats enzymatiques du saule sans prétraitement (entre 0 et 9 h), une augmentation de la DO de 2,1 à 9,4 a été notée (**Figure V.7 A**). Ensuite, on note une stabilisation dans la croissance de la levure avant que la DO augmente à nouveau jusqu'à 20,1 à 31 h. Au-delà, la croissance de *S. shehatae* augmente progressivement jusqu'à atteindre une DO maximale de 34,8 à 79 h. Il est à indiquer qu'en fin de culture la pureté des cultures est vérifiée en effectuant des isollements sur milieu YM glucose gélosé et qu'aucune contamination n'a été détectée.





**Figure V.7.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SHF du saule blanc non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

En suivant l'évolution de la concentration du glucose, il est remarqué que sa consommation par la levure débute après 28 h de culture puis devient nulle à 48 h. Ainsi, la première phase de croissance observée en début de culture (avant la consommation du glucose) peut être due à la consommation des constituants du milieu YM contenant entre autres des acides aminés, des hydrolysats de protéines et des facteurs de croissance. En plus, il est à rappeler que la présence du saule blanc provoque une turbidité dans les milieux de culture ce qui pourrait influencer les mesures de DO.

En absence de prétraitement, dans la période située entre 28 et 48 h, *S. shehatae* consomme tout le glucose initialement présent à 3,4 g/L. Une faible concentration d'éthanol de 0,2 g/L est détectée à 48 h et qui devient nulle à 55 h (**Figure V.7 A**).

Par ailleurs, les profils de croissance de *S. shehatae* sont différents sur les hydrolysats enzymatiques de saule blanc prétraité en fonction du LI utilisé. En effet, dans le cas de l'[Emim][OAc] (**Figure V.7 B**), la levure *S. shehatae* entre en phase exponentielle après une phase de latence de 31 h où la DO augmente de 5,9 (jusqu'à 41,6 à 79 h). La DO maximale observée sur les hydrolysats de saule prétraités à l'[Emim][OAc] est supérieure à celle obtenue sur le contrôle sans prétraitement. Cependant, dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**Figure V.7 C**), *S. shehatae* se développe sur ce milieu après une phase de latence plus longue (48 h) atteignant une DO maximale de 32,6 à 79 h, légèrement inférieure à celle du contrôle.

On remarque que *S. shehatae* présente un comportement différent de celui de *S. cerevisiae* sur les hydrolysats enzymatiques du saule blanc prétraité aux LI ou non. Rappelons que *S. cerevisiae* consomme immédiatement le glucose présent, alors que *S. shehatae*, même sur le contrôle sans prétraitement, démarre la consommation du glucose 28 h après l'inoculation des levures (**Figure V.7 A**). De plus, la présence de LI résiduel dans le saule blanc prétraité retarde la consommation du glucose (et donc prolonge la phase de latence) par *S. shehatae* jusqu'à 31 h pour l'[Emim][OAc] et 48 h pour l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Ce comportement de *S. shehatae* observé sur les hydrolysats enzymatiques de saule blanc a également été constaté sur les hydrolysats enzymatiques de polymères modèles cellulose et xylane présentés en chapitre IV.

Quant à la production d'éthanol, un maximum d'éthanol de 0,8 g/L et de 0,4 g/L a été noté respectivement dans le cas de prétraitement à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Cette concentration en éthanol plus élevée dans le cas de l'[Emim][OAc] malgré les concentrations initiales en glucose similaires (5,2 et 5,0 g/L pour l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement) met en évidence l'effet particulier de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sur la croissance et la fermentation éthanolique de *S. shehatae*. Toutefois, les rendements éthanoliques obtenus par *S. shehatae* à partir des hydrolysats enzymatiques de saule blanc sont faibles (**Tableau V.3**) et très inférieurs à ceux obtenus par *S. cerevisiae*.

**Tableau V.3.** Rendements maximaux en éthanol obtenus lors des cultures de *S. shehatae* à 30°C sur les hydrolysats enzymatiques du saule blanc avant et après prétraitement à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] 40 min à 35°C

Condition	Y <sub>éthanol</sub> maximal (%)	
	/[Cellulose] <sub>BLC</sub> <sup>a</sup>	/[Glucose] <sub>initial</sub> <sup>b</sup>
Sans prétraitement	3,9 ± 0,9%	10,4 ± 2,4%
[Emim][OAc]	18,3 ± 1,1%	31,8 ± 1,9%
[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	8,3 ± 0,0%	15,0 ± 0,0%

<sup>a</sup> à partir de la concentration initiale en BLC (20 g/L) en tenant compte de la teneur en cellulose constitutive

<sup>b</sup> à partir de la concentration initiale du glucose présente dans le milieu de culture

Deux hypothèses pourraient expliquer la faible production d'éthanol par *S. shehatae* à partir des hydrolysats enzymatiques de saule contrairement à ce qui a été observé sur monosaccharides et sur hydrolysats enzymatiques de polymères modèles. Les concentrations en sucres relativement faibles dans le cas du saule blanc (notamment le glucose avec 5 g/L environ) par rapport à celles du glucose ou du xylose pur (20 g/L) et même à celles sur polymères modèles (>12 g/L) pourraient orienter la levure vers un métabolisme respiratoire oxydatif au détriment de la fermentation éthanolique.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer cette faible production éthanolique viendrait du fait que la présence de lignines, des hémicelluloses, des extractibles ou un coproduit issu des étapes de prétraitement ou d'hydrolyse enzymatique pourrait limiter le métabolisme fermentaire chez *S. shehatae*.

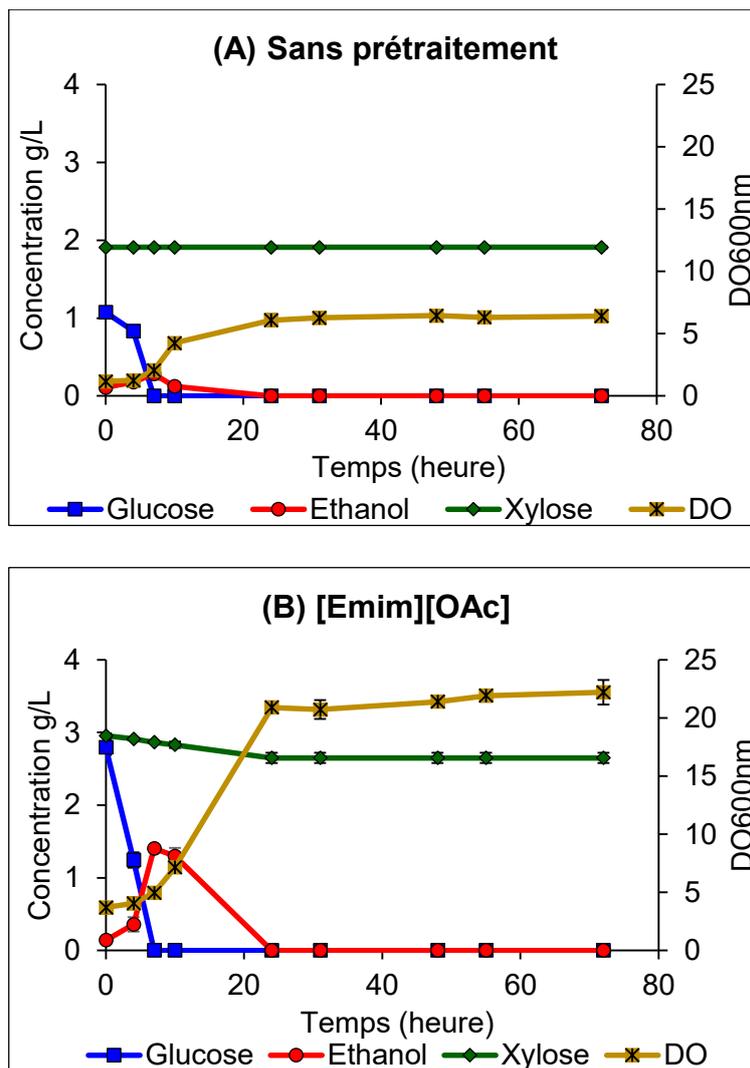
### 5.1.2. Son de blé désamidonné

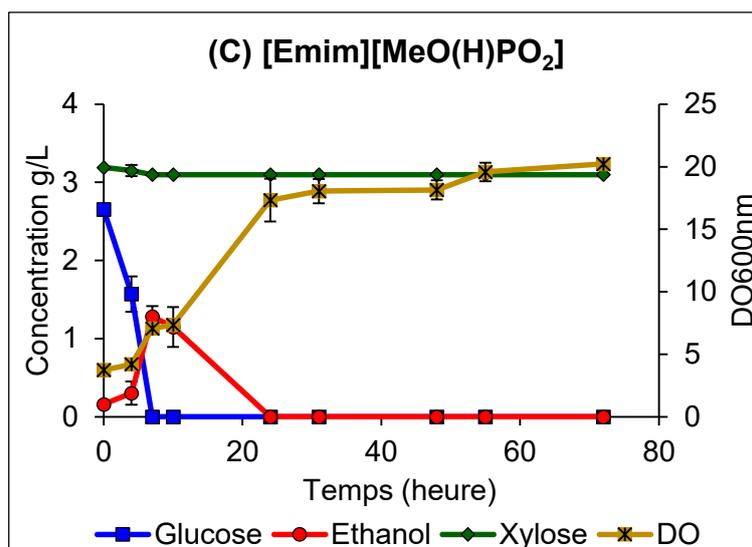
#### 5.1.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Comme pour le saule blanc, les cultures de *S. cerevisiae* ont été réalisées sur les hydrolysats enzymatiques de son de blé désamidonné sans et avec prétraitement à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Les résultats de mesures des DO, de

l'évolution des sucres et de l'éthanol sur les différentes conditions expérimentales sont représentés en **Figure V.8**.

Il est à rappeler que la composition du son de blé désamidonné est différente de celle du saule blanc avec une teneur en hémicellulose (40,9%) beaucoup plus élevée que le saule blanc (15,1%) (**Tableau V.1**), ce qui a conduit à une différence dans les rendements d'hydrolyse enzymatique en glucose et en xylose mentionnés plus haut (**Figures V.4 et 5**).





**Figure V.8.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SHF du son de blé désamidonné non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. cerevisiae* à 30°C

La croissance de *S. cerevisiae* sur hydrolysats enzymatiques de son de blé désamidonné est dépendante de la condition expérimentale. En effet, *S. cerevisiae* se développe sur les hydrolysats de son de blé désamidonné non prétraité après 4 h environ et atteint une DO maximale de 6,5 à 48 h (**Figure V.8 A**). Cependant, dans le cas du prétraitement du son de blé désamidonné, la levure entre en phase exponentielle après 4 h environ mais atteint des DO à 72 h supérieures à celle du contrôle : 22,2 et 20,2 pour l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement (**Figure V.8 B et C**). Ceci est probablement corrélé aux concentrations initiales en glucose supérieures dans le cas des substrats prétraités au LI. De plus, ces observations mettent en évidence que la présence de LI résiduel dans le son de blé désamidonné prétraité n'a pas d'effet délétère sur la croissance de *S. cerevisiae*. Toutefois, la croissance de *S. cerevisiae* sur hydrolysats enzymatiques du son de blé désamidonné est moins importante que celle dans le cas du saule blanc, ce qui peut être attribué au fait qu'il y a plus de glucose dans le saule blanc que dans le son de blé désamidonné.

Dans toutes les conditions expérimentales, le glucose est totalement consommé par les levures à 7 h alors que le xylose, n'étant pas assimilé, sa concentration demeure constante dans le milieu (sans prétraitement : 1,9 g/L, [Emim][OAc] : 2,9 g/L et [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] : 3,1 g/L). Le maximum d'éthanol, observé quand le glucose

est épuisé, est plus élevé dans le cas d'un prétraitement : 1,4 et 1,3 g/L pour l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement, par rapport au contrôle sans prétraitement : 0,3 g/L. Après la consommation totale du glucose, l'éthanol est à son tour consommé par *S. cerevisiae*, ce qui est accompagné par une augmentation de sa croissance. Les rendements éthanoliques maximaux obtenus par *S. cerevisiae* sur hydrolysats enzymatiques du son de blé désamidonné sont regroupés dans le **Tableau V.4.**

**Tableau V.4.** Rendements maximaux en éthanol (en %) obtenus lors des cultures de *S. cerevisiae* à 30°C sur les hydrolysats enzymatiques du son de blé désamidonné avant et après prétraitement à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] 40 min à 35°C

Condition	Y <sub>éthanol</sub> maximal (%)	
	/[Cellulose] <sub>BLC</sub> <sup>a</sup>	/[Glucose] <sub>initial</sub> <sup>b</sup>
Sans prétraitement	11,8 ± 0,9%	57,5 ± 5,7%
[Emim][OAc]	58,6 ± 0,3%	98,2 ± 0,5%
[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	49,7 ± 5,2%	94,5 ± 9,9%

<sup>a</sup> à partir de la concentration initiale en BLC (20 g/L) en tenant compte de la teneur en cellulose constitutive

<sup>b</sup> à partir de la concentration initiale du glucose présente dans le milieu de culture

Ces résultats montrent que les rendements éthanoliques sont multipliés d'un facteur de 5,0 (de 11,8 à 58,6%) après prétraitement du son de blé désamidonné à l'[Emim][OAc] et de 4,2 (de 11,8 à 49,7%) à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], ce qui met l'accent à nouveau que le LI résiduel n'inhibe pas la production d'éthanol par *S. cerevisiae*.

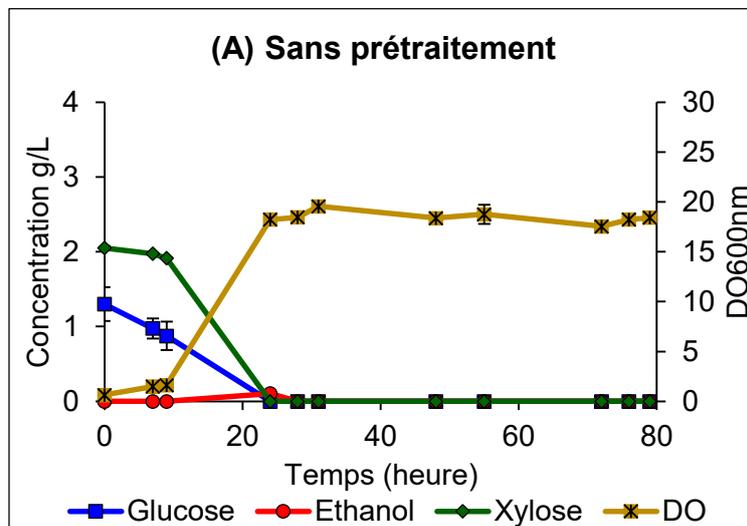
Enfin, *S. cerevisiae* génère un rendement de 0,50 et 0,48 g éthanol/g glucose à partir du son de blé désamidonné prétraité à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement, contre 0,26 g/g pour le contrôle. Alors que, les rendements éthanoliques de *S. cerevisiae* à partir du saule blanc sont similaires : 0,48, 0,49 et 0,48 g éthanol/g glucose sur le saule blanc non prétraité et prétraité à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de

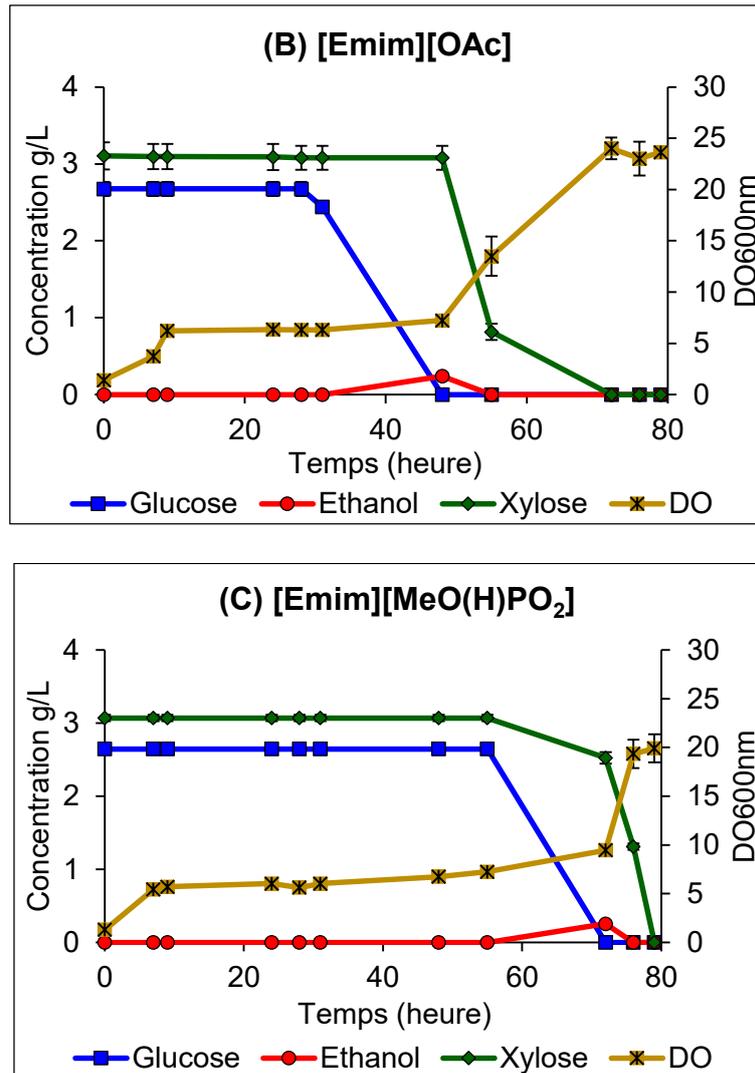
différence entre les deux LI sur les rendements éthanoliques obtenus à partir des deux BLC et que l'impact du prétraitement est davantage lié à la nature de la BLC.

Ces rendements éthanoliques obtenus par *S. cerevisiae* en présence de LI résiduel sont plus élevés que les rendements éthanoliques de *S. cerevisiae* rapportés dans d'autres études sur d'autres BLC. En effet, Li *et al.* (2009) ont obtenu un rendement de 0,43 g éthanol/g glucose à partir de la paille de blé prétraitée par le 1-éthyl-3-méthylimidazolium diéthyl phosphate [Emim][DEP] alors que Lienqueo *et al.* (2016) ont trouvé un rendement de 0,13 g éthanol/g glucose sur les résidus de *Eucalyptus globulus* prétraités par le 1-N-éthyl-3-méthylimidazolium chlorure [Emim][Cl] contre un rendement de 0,002 g éthanol/g glucose sans prétraitement, en utilisant *S. cerevisiae* Ethanol Red.

### 5.1.2.2. *Scheffersomyces shehatae*

La levure *S. shehatae* a également été cultivée sur les hydrolysats enzymatiques du son de blé désamidonné et les résultats de ces cultures sont montrés en **Figure V.9.**





**Figure V.9.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SHF du son de blé désamidonné non prétraité (A) et prétraité à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

Ces résultats montrent que l'allure de la courbe de croissance de *S. shehatae* varie selon les conditions expérimentales. Sur les hydrolysats du son de blé désamidonné non prétraité, *S. shehatae* entre en phase exponentielle après 9 h environ de phase de latence et atteint un maximum de DO de 19,5 à 31 h (Figure V.9 A). En revanche, sur les substrats prétraités aux LI, le profil de croissance de *S. shehatae* est différent avec une phase de latence plus longue : 48 et 72 h, respectivement dans le cas de l'[Emim][OAc] et de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Figure V.9 B et C). Toutefois, une légère augmentation de la DO ([Emim][OAc] : de 1,4 à 6,2 et [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] de 1,3 à 5,7) a été observée durant les 9 premières heures des cultures de *S. shehatae* sur les hydrolysats du son de blé désamidonné prétraité. Cette

observation déjà rencontrée avec *S. shehatae* sur le saule blanc peut être attribuée à la consommation des composants du milieu YM comme mentionné précédemment. La DO maximale atteinte sur les hydrolysats du son de blé désamidonné prétraité est supérieure au contrôle ; dans le cas de l'[Emim][OAc], une valeur maximale de DO de 24,0 est enregistrée à 72 h alors que dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], la DO maximale de 19,9 est notée à 79 h. Ainsi, le LI résiduel dans le son de blé désamidonné prétraité a provoqué une phase de latence plus longue sans que le maximum de DO en soit affecté.

En outre, l'évolution de la concentration des sucres explique les profils de croissance de *S. shehatae* observés. Dans le cas du son de blé désamidonné non prétraité, le glucose et le xylose, dont les concentrations initiales sont respectivement de 1,3 et 2,1 g/L, sont totalement consommés après 24 h (**Figure V.9 A**). Sur les hydrolysats du son de blé désamidonné prétraité à l'[Emim][OAc], l'épuisement du glucose s'effectue après 48 h alors que le xylose s'épuise après 72 h. Cependant, dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] où la phase de latence était la plus longue, la consommation totale du glucose a eu lieu à 72 h et celle du xylose à 79 h. Ces résultats soulignent que le glucose est le substrat carboné préféré pour *S. shehatae* en concordance avec d'autres études (Kim *et al.*, 2010 ; Antunes *et al.*, 2018). Toutefois, une faible production d'éthanol a été détectée au moment de l'épuisement du glucose : 0,1 g/L pour le contrôle sans prétraitement et 0,2 g/L et 0,3 g/L à partir des hydrolysats prétraités à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement, ce qui correspond aux rendements (calculés à partir de la concentration initiale en glucose et xylose initialement présents) respectifs suivants 6,1, 8,1 et 8,7% (0,03 et 0,04 g éthanol/g sucre, respectivement). Cette faible production d'éthanol par *S. shehatae*, également trouvée dans le cas du saule blanc pourrait être attribuée aux faibles concentrations initiales en glucose et/ou xylose, favorisant ainsi la multiplication cellulaire au détriment de la fermentation éthanolique.

D'autres études ont rapporté une meilleure production d'éthanol par *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 sur les hydrolysats enzymatiques de bagasse de canne à sucre mais avec des concentrations initiales en sucres (glucose et xylose) plus élevées en comparaison avec les concentrations initiales dans le cas du saule blanc et du son de blé désamidonné étudiés dans notre cas (Antunes *et al.*, 2014 ; Antunes *et al.*, 2018). En effet, une production d'éthanol d'environ 10 g/L a été obtenue à partir des

hydrolysats enzymatiques de bagasse de canne à sucre contenant initialement 25 g/L de sucres (glucose et xylose), soit un rendement de 0,40 g éthanol/g sucre (Antunes *et al.*, 2014). Cependant, Antunes *et al.* (2018) ont trouvé dans une étude ultérieure un rendement inférieur (0,32 g éthanol/g sucre) en utilisant la même BLC et la même souche de *S. shehatae* mais à partir d'une concentration inférieure en sucres (6 g/L d'éthanol à partir de 13 g/L de glucose et 4 g/L de xylose). Les résultats de ces travaux mettent en avant que l'efficacité de la production d'éthanol chez *S. shehatae* semble dépendante de la concentration initiale du sucre dans le milieu de culture.

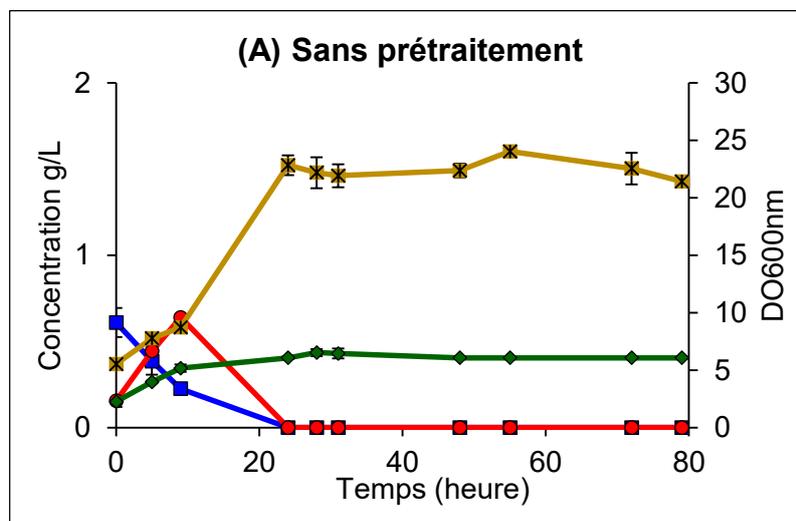
## 5.2. Procédé simultané d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, SSF

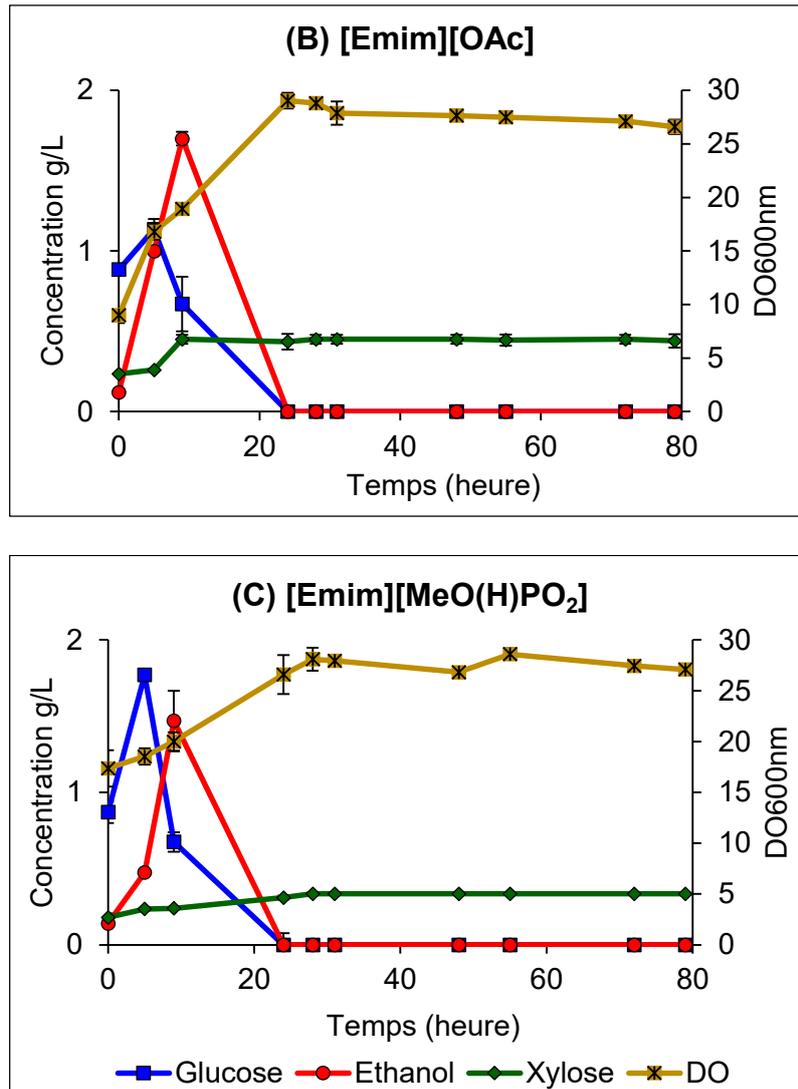
L'effet de combiner l'étape d'hydrolyse enzymatique des substrats lignocellulosiques (saule blanc et son de blé désamidonné) par les cellulases et les xylanases à l'étape de fermentation éthanolique par les levures *S. cerevisiae* ou *S. shehatae* a été également étudié. Le procédé simultané SSF est réalisée à 30°C tout comme le procédé séquentiel SHF où l'hydrolyse enzymatique et la fermentation ont également été effectuées à 30°C mais séquentiellement.

### 5.2.1. Saule blanc

#### 5.2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Les mesures spectrophotométriques reflétant la croissance de *S. cerevisiae* lors de la SSF de saule ainsi que les concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol sont représentées en **Figure V.10**.





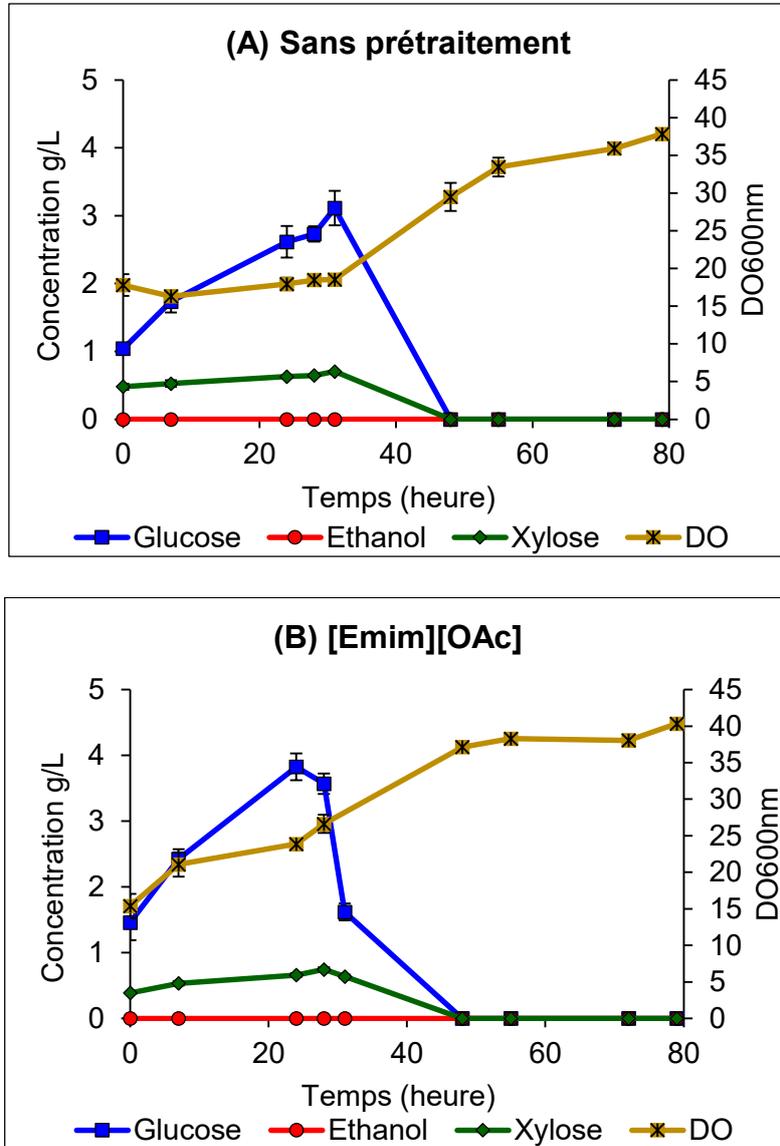
**Figure V.10.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SSF du saule blanc non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. cerevisiae* à 30°C

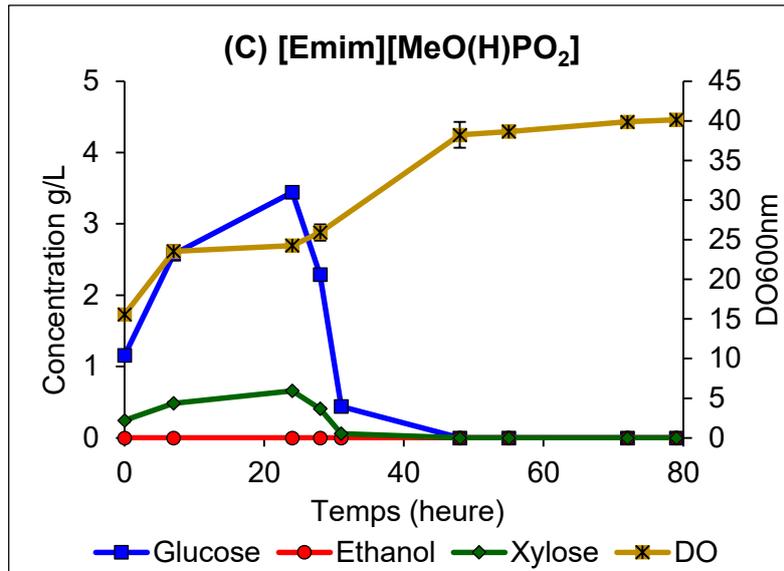
Sur le saule blanc non prétraité, la levure *S. cerevisiae* se développe jusqu'à une DO maximale de 24,0 à 55 h (**Figure IV.10 A**). Sur le saule prétraité à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], l'allure de la courbe de croissance est similaire à celle du contrôle. Alors que dans le cas de l'[Emim][OAc], la DO augmente de 9,0 à 29,0 après 24 h (**Figure IV.10 B**), elle augmente de 17,3 à 28,6 à 55 h dans le cas de l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**Figure V.10 C**). Par conséquent, la croissance de *S. cerevisiae* en présence d'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] résiduel paraît plus faible que celle dans le cas d'[Emim][OAc] ou le contrôle. Toutefois, il est remarquable que les DO au début des cultures sont élevées et par conséquent, les mesures de DO ne sont pas très fiables mais permettent de vérifier que les levures poussent.

En ce qui concerne l'évolution des sucres libérés lors de l'hydrolyse enzymatique, il est à indiquer que les concentrations obtenues représentent la résultante entre l'hydrolyse enzymatique catalysée par les cellulases et les xylanases et la consommation des sucres par les levures. Ces résultats montrent que dans toutes les conditions expérimentales, le glucose est consommé par *S. cerevisiae*, mais pas le xylose libéré par les xylanases à une concentration de 0,4 g/L environ. Le maximum d'éthanol a été observé après 9 h dans les trois conditions testées et est de 0,6, 1,7 et 1,5 g/L, respectivement à partir de saule blanc non prétraité et prétraité à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Au-delà de 9 h, l'éthanol produit est consommé par *S. cerevisiae*, similairement à ce qui a été mentionné plus haut. Les rendements éthanoliques peuvent être calculés en fonction de la BLC initiale en tenant compte de la teneur en cellulose constitutive. Ainsi, les rendements éthanoliques maximaux obtenus lors de la SSF de saule blanc sont de 13,8% pour le contrôle sans prétraitement et de 36,8 et 31,8% dans le cas de prétraitement de saule blanc à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Le prétraitement du saule blanc par l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] à 35°C a donc permis une augmentation de la production d'éthanol par *S. cerevisiae* d'un facteur de 2,7 et 2,3, respectivement. Toutefois, ces rendements maximaux obtenus en SSF sont inférieurs à ceux en SHF qui étaient de 34,9% pour le contrôle et de 50,1 et 44,4% après prétraitement du saule blanc à l'[Emim][OAc] ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. Ceci pourrait être attribué à l'effet de la concentration du glucose dans le milieu qui, d'autant plus élevée, favorise la métabolisation du glucose via la fermentation éthanolique plutôt que d'autres voies métaboliques.

5.2.1.2. *Scheffersomyces shehatae*

Le procédé simultané SSF a été aussi étudié avec la levure *S. shehatae* sur le saule blanc non prétraité et prétraité aux LI et les résultats sont présentés en **Figure V.11**.





**Figure V.11.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SSF du saule blanc non prétraitée (A) et prétraitée à l' [Emim][OAc] (B) ou à l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

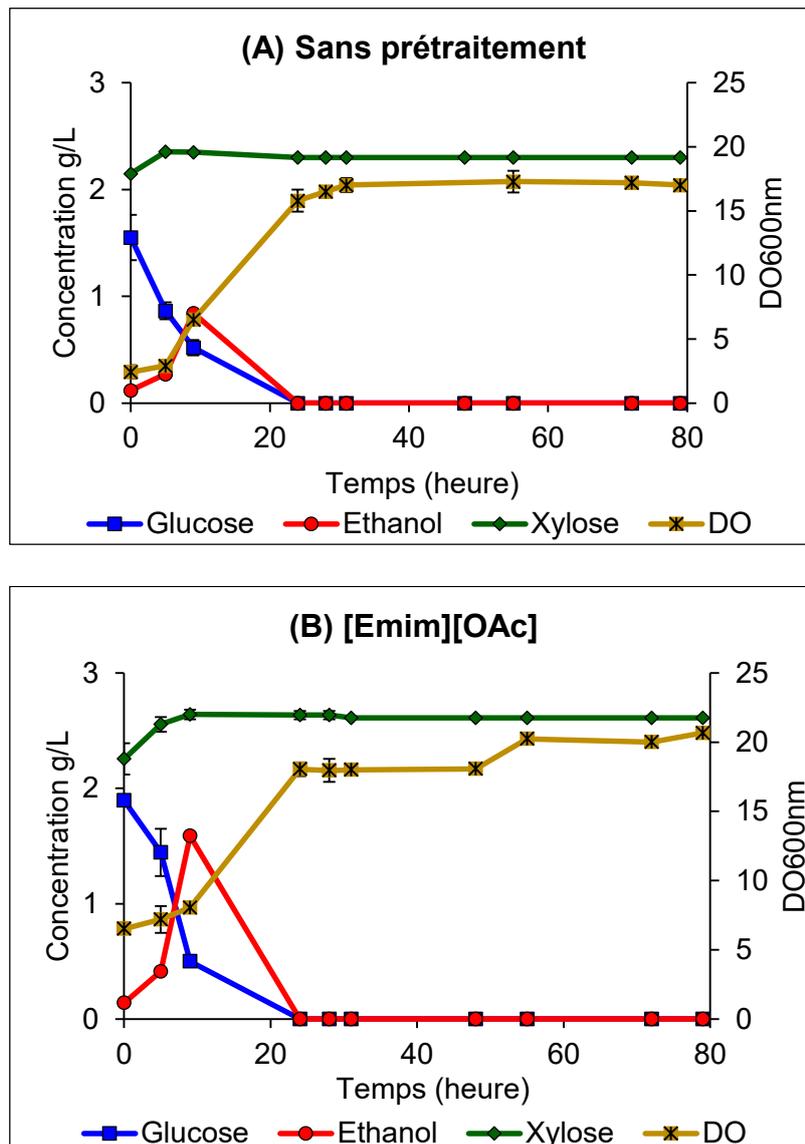
En SSF, contrairement à la SHF, la croissance de *S. shehatae* montre une allure de courbe de croissance similaire sur le saule blanc non prétraité et prétraité aux LI, et l'effet du LI résiduel est peu visible. En effet, en absence du prétraitement, la DO maximale atteinte est de 37,8 (**Figure V.11 A**) alors que dans le cas du saule blanc prétraité la DO maximale est plus élevée : 40,3 pour l' [Emim][OAc] (**Figure V.11 B**) et 40,1 pour l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**Figure V.11 C**).

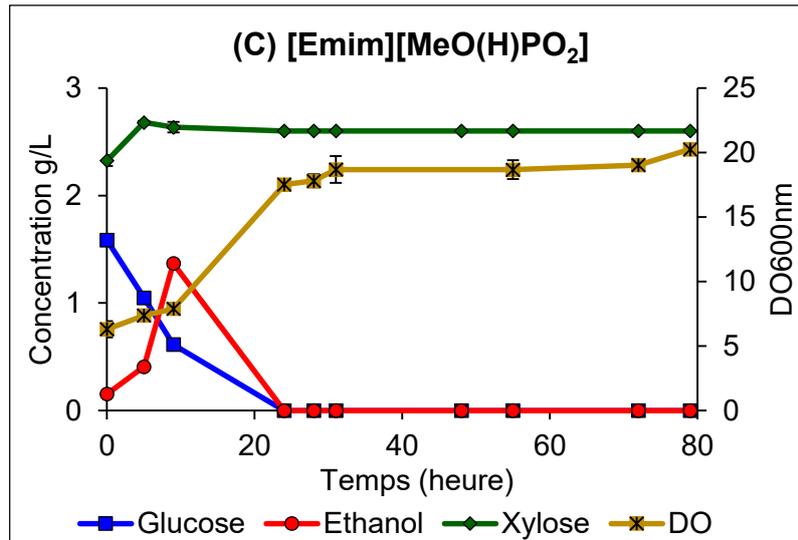
Par ailleurs, lors de la SSF du saule blanc, les concentrations du glucose et du xylose augmentent en début de culture puisqu'ils sont libérés par hydrolyse enzymatique. Ensuite, ces concentrations diminuent du fait que les deux sucres sont consommés par *S. shehatae*. Cependant, aucune production d'éthanol n'est détectée dans le milieu quelle que soit la condition expérimentale sans ou avec prétraitement aux LI. Une hypothèse explicative serait que lors de la SSF, les sucres libérés sont consommés au fur et à mesure par les levures ce qui mène à des concentrations en sucres encore plus faibles qu'en SHF, empêchant ainsi la fermentation éthanolique. Il se peut aussi que lors de la SSF, les enzymes interagissent avec les parois des levures constituées de polysaccharides (glucanes et mannanes) ce qui pourrait inhiber la fermentation des sucres en éthanol.

5.2.2. Son de blé désamidonné

5.2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Les mesures de DO enregistrées lors des cultures de *S. cerevisiae* lors de la SSF du son de blé désamidonné ainsi que les concentrations de sucres et de l'éthanol sont montrés dans la **Figure V.12**.





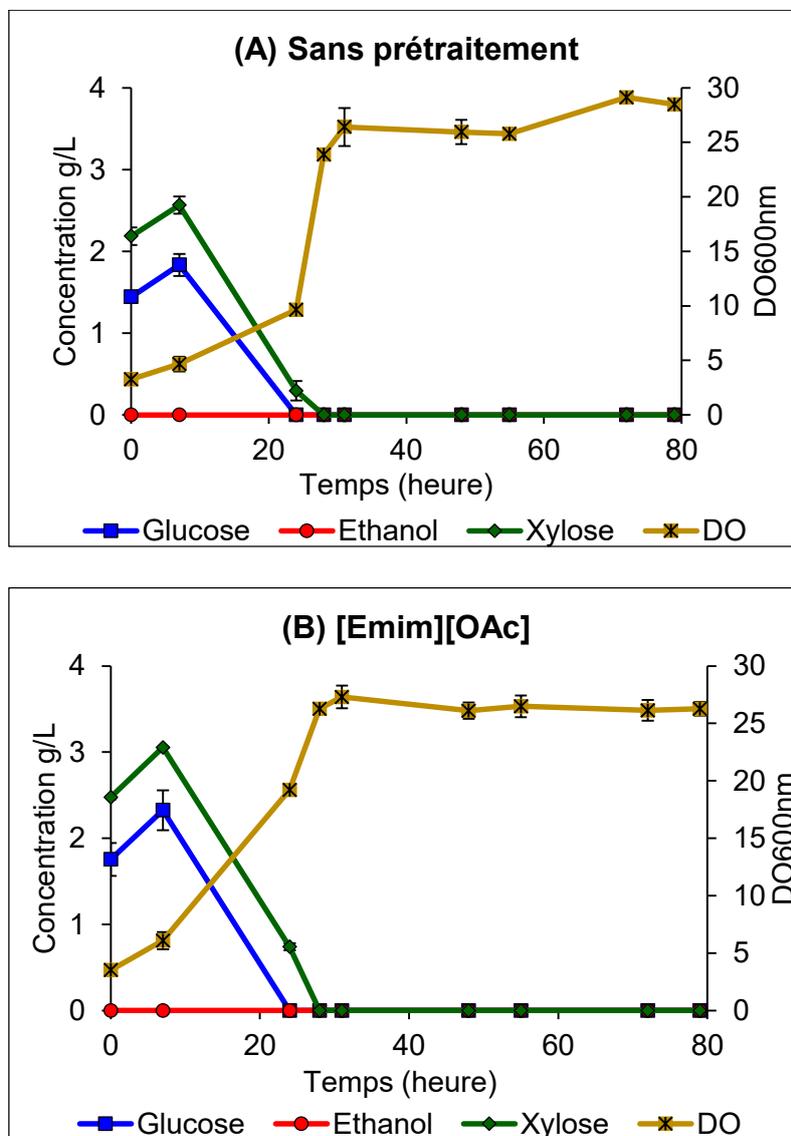
**Figure V.12.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SSF du son de blé désamidonné non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. cerevisiae* à 30°C

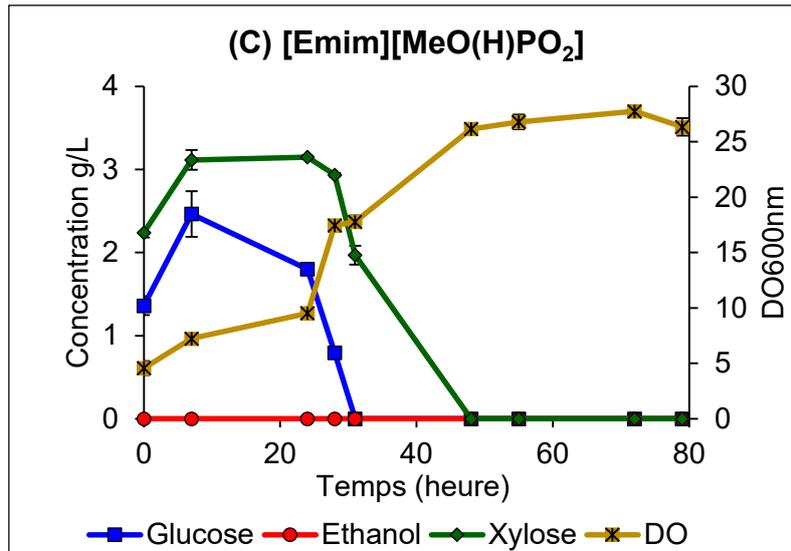
En suivant l'évolution de la courbe de DO, il est montré que pour les trois conditions expérimentales : son de blé désamidonné non prétraité (**Figure V.12 A**) et prétraité à l'[Emim][OAc] (**Figure V.12 B**) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (**Figure V.12 C**) la croissance de *S. cerevisiae* suit une allure de courbe similaire. En effet, les DO maximales enregistrées à 79 h dans le cas de l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] sont très proches : 20,6 et 20,2, respectivement mais plus élevées par rapport à celle du contrôle sans prétraitement : 17,0. Ces résultats mettent en avant qu'en SSF comme en SHF, le LI résiduel dans le son de blé désamidonné prétraité montre peu d'effet sur la croissance de *S. cerevisiae*. Quant aux sucres libérés par hydrolyse enzymatique, on remarque que *S. cerevisiae* ne consomme pas le xylose (similairement à la SHF et aussi au cas du saule blanc mentionnés plus haut) alors qu'elle métabolise le glucose pour produire de la biomasse cellulaire et de l'éthanol. Dans toutes les conditions testées, la concentration maximale d'éthanol est notée à 9 h et est de 0,8 g/L pour le contrôle tandis qu'elle s'élève à 1,6 et 1,4 g/L après prétraitement de son de blé désamidonné à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectivement. De plus, les rendements éthanologiques peuvent être calculés par rapport à la BLC initiale en considérant la teneur en cellulose puisque seul le glucose a été consommé et converti en éthanol. Alors que *S. cerevisiae* produit 35,2% à partir du son de blé désamidonné non prétraité, elle génère des rendements plus élevés après prétraitement à l'[Emim][OAc] et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] : 66,3% et 57,2%,

respectivement. Toutefois, l'[Emim][OAc] permet une meilleure augmentation des rendements d'un facteur de 1,9 par rapport à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] qui multiplie les rendements d'un facteur de 1,6. En comparant ces rendements éthanoliques avec ceux obtenus en SHF du son de blé désamidonné (sans prétraitement : 11,8%, [Emim][OAc] : 58,6% et [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] : 49,7%), il est constaté que les rendements ont été améliorés en SSF, ce qui n'était pas le cas du saule blanc.

### 5.2.2.2. *Scheffersomyces shehatae*

Les mesures de DO ainsi que les analyses chromatographiques du glucose, du xylose et de l'éthanol obtenus lors des cultures de *S. shehatae* lors de la SSF du son de blé désamidonné sont représentés en **Figure V.13**.





**Figure V.13.** Cinétiques de croissance et concentrations du glucose, du xylose et de l'éthanol au cours de SSF du son de blé désamidonné non prétraitée (A) et prétraitée à l'[Emim][OAc] (B) ou à l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (C) avec *S. shehatae* à 30°C

Sur le son de blé désamidonné non prétraité, *S. shehatae* se développe jusqu'à atteindre une DO maximale de 29,1 à 72 h (Figure V.13 A). Dans le cas du son de blé désamidonné prétraité, les maximums de DO mesurés sont de 27,3 et 27,7 dans le cas de l'[Emim][OAc] (Figure V.13 B) et l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Figure V.13 C), respectivement. Ces résultats montrent que la croissance de *S. shehatae* est peu affectée par le LI résiduel présent dans le son de blé désamidonné prétraité. En revanche, en SHF, le profil de croissance de *S. shehatae* sur le son de blé prétraité aux LI est différent avec une phase de latence plus longue provoquée par le LI résiduel dans le son de blé désamidonné prétraité. Ceci suggère que l'effet du LI résiduel dans le son de blé désamidonné prétraité est plus remarquable lorsque la concentration en sucres dans le milieu est plus importante (ce qui est différent entre SHF et SSF).

Quant à la consommation des sucres, *S. shehatae* montre des profils de consommation des sucres similaires sur le son de blé désamidonné non prétraité ou prétraité à l'[Emim][OAc] alors que dans le cas l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], ce profil est un peu plus différent (Figure V.14 C). Dans ce dernier cas, on note une plus longue accumulation du glucose et du xylose en comparaison avec les deux autres conditions, avant qu'ils soient consommés tous les deux par *S. shehatae*. Dans toutes les conditions testées, le glucose et le xylose sont complètement consommés par la levure mais sans aucune production d'éthanol, comme dans le cas du saule blanc. Ces

observations rejoignent ce qui est mentionné plus haut, que des faibles concentrations en sucres ne favorisent pas la fermentation éthanolique chez *S. shehatae* contrairement à *S. cerevisiae* qui génère des rendements éthanoliques élevés dans les mêmes conditions. Ceci peut être expliqué par les divergences métaboliques de ces deux espèces étant donné que *S. cerevisiae* est Crabtree-positive alors que *S. shehatae* est Crabtree-négative.

## 6. Conclusion partielle

Le prétraitement à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] à 35°C a conduit à une amélioration des rendements d'hydrolyse enzymatique par les cellulases de *T. reesei* et les xylanases de *T. longibrachiatum* des deux substrats lignocellulosiques testés : le saule blanc et le son de blé désamidonné. Ainsi, le LI résiduel piégé dans la BLC prétraitée ne semblerait pas provoquer une désactivation majeure des cellulases et/ou xylanases. Toutefois les paramètres de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique devraient être ajustés et optimisés selon la BLC considérée afin d'aboutir à un meilleur compromis entre l'efficacité du prétraitement à améliorer les rendements d'hydrolyse enzymatique et le concept de minimiser la demande énergétique du processus.

Concernant la fermentation éthanolique par les levures, il semble difficile de généraliser l'effet du LI sur les levures car il varie selon la nature du LI, le type de BLC, l'espèce de levure ainsi que la concentration du glucose dans le milieu (SHF et SSF) (**Tableaux V.5 et 6**).

**Tableau V.5.** Rendements éthanoliques maximaux (en %) obtenus par *S. cerevisiae* et *S. shehatae* sur le saule blanc pour les différentes conditions testées

Condition	Espèce de levure utilisée	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. shehatae</i>
<b>SHF Sans prétraitement</b>	34,9 ± 1,1%	3,9 ± 0,9%
<b>SSF Sans prétraitement</b>	13,8 ± 0,3%	0 ± 0,0%
<b>SHF [Emim][OAc]</b>	50,1 ± 1,4%	18,3 ± 1,1%
<b>SSF [Emim][OAc]</b>	36,8 ± 0,9%	0 ± 0,0%
<b>SHF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	44,4 ± 2,8%	8,3 ± 0,0%
<b>SSF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	31,8 ± 4,3%	0 ± 0,0%

**Tableau V.6.** Rendements éthanoliques maximaux (en %) obtenus par *S. cerevisiae* et *S. shehatae* sur le son de blé désamidonné pour les différentes conditions testées

Condition	Espèce de levure utilisée	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. shehatae</i>
<b>SHF Sans prétraitement</b>	11,8 ± 0,9%	1,5 ± 0,1%
<b>SSF Sans prétraitement</b>	35,2 ± 0,3%	0 ± 0,0%
<b>SHF [Emim][OAc]</b>	58,6 ± 0,3%	3,4 ± 0,6%
<b>SSF [Emim][OAc]</b>	66,3 ± 1,2%	0 ± 0,0%
<b>SHF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	49,7 ± 5,2%	3,6 ± 0,3%
<b>SSF [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]</b>	57,2 ± 1,2%	0 ± 0,0%

La levure modèle *S. cerevisiae* génère des rendements en éthanol élevés sur le saule blanc et le son de blé désamidonné et le prétraitement de ces BLC à l' [Emim][OAc] ou l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] a permis une amélioration de la production d'éthanol (**Tableaux V.5 et 6**). Ainsi, les autres constituants de la BLC telles que les lignines, les hémicelluloses et les extractibles ne sembleraient pas exercer une influence majeure sur la production d'éthanol par la levure *S. cerevisiae*.

En revanche, la levure *S. shehatae* montre une croissance plus sensible à la présence de LI résiduel surtout dans le cas de l' [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] mais aussi en fonction de la BLC testée et du procédé appliqué, SHF ou SSF (et donc en fonction de la concentration de sucres dans le milieu). Toutefois, *S. shehatae* produit de très faibles rendements en éthanol en comparaison avec *S. cerevisiae* (**Tableaux V.5 et 6**), mais également en comparaison avec les rendements éthanologiques de *S. shehatae* obtenus sur monomères et sur polymères modèles (présentés dans les chapitres 1 et 2). Ces faibles rendements par *S. shehatae* sur BLC pourraient être dus à l'effet des autres constituants présents dans la BLC ou aussi aux faibles concentrations de glucose et/ou du xylose présents dans les hydrolysats de BLC, par rapport à celles sur monomères ou polymères modèles. Ces faibles concentrations en sucres dans le milieu sembleraient limiter le métabolisme fermentaire chez *S. shehatae*. Pour cette raison, afin de confirmer l'une des deux hypothèses émises, il a été envisagé d'étudier la fermentation par *S. shehatae* sur différentes concentrations de glucose et/ou xylose pur(s) (proches de celles obtenues dans nos conditions expérimentales sur hydrolysats enzymatiques du saule blanc et du son de blé désamidonné) mais faute de temps, ces expériences n'ont pu être réalisées.

Enfin, la comparaison des procédés SHF ou SSF dépend de la BLC utilisée et également de l'espèce de levure. La levure *S. cerevisiae* produit plus d'éthanol à partir du son de blé désamidonné en SSF qu'en SHF, or, ce n'était pas le cas pour le saule blanc. En outre, *S. shehatae* produisant à partir des deux BLC utilisés de très faibles rendements éthanologiques en SHF, n'a montré aucune production éthanologique en SSF.

*Conclusion Générale*  
*&*  
*Perspectives*

Au regard des problèmes liés à l'utilisation des ressources fossiles épuisables ou potentiellement d'accès difficiles et avec l'augmentation de la demande énergétique qui ne cesse de croître, les efforts se sont concentrés pour diminuer la dépendance aux énergies pétrolières en trouvant des nouvelles alternatives renouvelables et écoresponsables. La production de biocarburants constitue un enjeu majeur de la société actuelle d'un point de vue économique et environnemental.

La biomasse lignocellulosique (BLC) représente une source de carbone organique durable puisqu'elle dérive de la conversion par les plantes du dioxyde de carbone atmosphérique en matières organiques grâce à l'énergie solaire. La combustion du carbone contenu dans la BLC permet ainsi de réduire l'émission des gaz à effet de serre car la replantation de la biomasse récoltée garantit que le CO<sub>2</sub> produit soit absorbé et retourne dans un cycle court de nouvelle croissance, contrairement aux combustibles fossiles qui utilisent le carbone enfoui dans le sol depuis des millions d'années.

L'objectif de cette thèse était de valoriser les polysaccharides constitutifs de la BLC, à savoir la cellulose et l'hémicellulose, en vue de production de bioéthanol 2G dans des conditions douces et respectueuses de l'environnement.

La première partie de cette étude a été consacrée à l'étude des caractéristiques de croissance et de fermentation éthanolique de quatre espèces de levures sauvages sur monosaccharides (hexoses et pentoses) constitutifs de la BLC, en conditions aérobies et limitées en oxygène. Les résultats obtenus sur cette partie ont montré que les deux levures modèles de fermentation d'hexoses, *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus* ne sont pas capables d'assimiler les pentoses (xylose et arabinose) et le xylitol. Toutefois, *S. cerevisiae* produit plus d'éthanol sur hexoses que *K. marxianus*, aussi bien en conditions aérobies qu'en conditions limitées en oxygène. Les levures modèles de fermentation de pentoses, *Scheffersomyces shehatae* et *Scheffersomyces stipitis* produisent de l'éthanol sur hexoses et sont aussi capables de fermenter le xylose en éthanol, en conditions aérobies et limitées en oxygène, mais l'arabinose n'a pas été fermenté en éthanol bien qu'il a été consommé par ces deux levures. De plus, nos résultats ont montré que la limitation en oxygène favorise la fermentation des monosaccharides en éthanol quelle que soit l'espèce considérée. En terme de rendements éthanoliques, *S. cerevisiae* s'est montrée la meilleure levure fermentaire à partir des hexoses. Le glucose représente le meilleur

substrat éthanologénique pour les quatre espèces de levures étudiées. Concernant le xylose, les deux levures *S. shehatae* et *S. stipitis* ont montré des rendements éthanologiques proches sur ce pentose, qui restent pourtant inférieurs par rapport aux hexoses. Les résultats de cultures des levures sur cellobiose, un dimère de glucose, ont montré que *S. cerevisiae* et *K. marxianus* ne sont pas capables d'assimiler le cellobiose, alors que *S. shehatae* et *S. stipitis* le consomment mais sans production d'éthanol.

La deuxième partie de ce travail a porté sur la conversion par voie enzymatique des polymères modèles, cellulose et xylane, en sucres fermentescibles par des cellulases de *T. reesei* et des xylanases de *T. longibrachiatum*. Deux LI hydrophiles : le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ont été utilisés pour le prétraitement de la cellulose modèle à 35°C et leur effet sur l'hydrolyse enzymatique de celle-ci a été évalué. Les résultats ont mis en évidence la capacité de ces deux LI à solubiliser la cellulose à 35°C et à améliorer les rendements d'hydrolyse enzymatique en glucose. Ensuite, les hydrolysats enzymatiques de la cellulose avec ou sans prétraitements aux LI ont été utilisés pour l'étape de fermentation éthanologique en tant que substrat éthanologénique pour les quatre levures. La présence du LI résiduel dans la cellulose prétraitée depuis l'étape de prétraitement a également été évaluée sur la croissance et la fermentation éthanologique par les quatre levures. Les résultats de ces études ont mis en évidence que le prétraitement de la cellulose aux LI permet d'augmenter les rendements éthanologiques quelle que soit la levure utilisée. Par ailleurs, l'effet du LI résiduel sur la croissance et/ou la fermentation éthanologique par les levures est influencé par l'anion constitutif du LI et également par l'espèce de levure testée.

D'autre part, les cultures de *S. shehatae* et *S. stipitis* sur les hydrolysats enzymatiques du xylane ont mis en avant que *S. shehatae* fermente plus efficacement ces hydrolysats en éthanol que *S. stipitis* bien que les deux levures aient montré des rendements en éthanol quasiment similaires sur xylose pur. Ce qui montre que la capacité des levures à fermenter en éthanol les résidus xylose présents dans le xylane du hêtre, souvent substitués par des acides glucuroniques ou leurs dérivés méthylés et des groupements acétyles, diffère d'une espèce à une autre.

Suite à ces résultats obtenus sur polymères modèles, les deux levures *S. cerevisiae* et *S. shehatae* ont été sélectionnées pour transposer l'étude à des substrats lignocellulosiques.

Enfin, deux types de BLC ont été étudiés : les résidus de saule blanc (résidu forestier) et le son de blé désamidonné (déchet issu de l'industrie agroalimentaire). Le choix de ces deux BLC a été fait dans le but d'étudier deux types de substrats distincts par leur origine et leur composition chimique. Le son de blé désamidonné est une BLC riche en hémicellulose qui permet de valoriser en plus de la cellulose, la fraction hémicellulosique (riche en xylose) en bioéthanol. Les résultats ont mis en évidence que le prétraitement de ces deux BLC à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] à 35°C a permis une augmentation des rendements d'hydrolyse enzymatique par les cellulases et les xylanases. De plus, l'étude de la composition chimique des deux BLC a permis de montrer que le prétraitement aux LI pendant 40 min à 35°C n'induit pas de délignification ou de perte des hémicelluloses, indiquant que le prétraitement aux LI à basses températures permet d'envisager un fractionnement des trois polymères principaux constitutifs de la lignocellulose.

La fermentation éthanolique des hydrolysats enzymatiques des BLC a montré que *S. cerevisiae* génère des rendements élevés en éthanol et que le prétraitement du saule blanc et du son de blé désamidonné à l'[Emim][OAc] ou l'[Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] a amélioré les rendements éthanoliques. Les deux LI utilisés montrent une amélioration similaire des rendements de l'hydrolyse enzymatique et également de la fermentation éthanolique.

En revanche, la levure *S. shehatae* produit des très faibles rendements en éthanol à partir des hydrolysats enzymatiques des deux BLC en comparaison avec *S. cerevisiae*. Ce résultat est curieux puisque cette levure produit de bons rendements éthanoliques sur monosaccharides et sur hydrolysats enzymatiques de cellulose et de xylane. Cette faible production d'éthanol par *S. shehatae* sur BLC pourrait être due aux concentrations initiales en sucres qui sont largement inférieures par rapport aux monomères et aux polymères modèles ou aux autres constituants de la BLC.

De plus, deux procédés d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique ont été testés : procédé séquentiel, *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF) et procédé simultané, *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Nos

études appliquées aux polymères modèles et aux BLC ont montré que la performance des deux procédés testés, SHF et SSF, est variable et dépendante du substrat initial et de l'espèce de levure utilisée.

Ainsi, ces travaux montrent que même à basse température, les LI sont des solvants prometteurs pour le prétraitement de la (ligno)cellulose tout en préservant l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique et par la suite de la production d'éthanol. La présence de faibles concentrations résiduelles en LI dans les substrats prétraités ne semble pas provoquer de désactivation majeure des enzymes, ni de réduction de la capacité fermentaire des levures. Toutefois, l'effet du LI résiduel sur les levures est difficilement généralisable, il dépend de la concentration du LI, de l'anion constitutif de celui-ci, du substrat prétraité et de l'espèce de levure utilisée.

La poursuite de ce travail ouvre la porte à plusieurs perspectives. Il serait tout d'abord intéressant de faire une implémentation des travaux à court terme et de vérifier les hypothèses avancées. Des cultures de *S. shehatae* sur milieu Yeast-Malt (YM) avec des concentrations croissantes en glucose et/ou en xylose pur(s) seront envisagées (en commençant par des concentrations proches de celles obtenues dans nos conditions expérimentales sur hydrolysats enzymatiques du saule blanc et du son de blé désamidonné) afin de mieux comprendre la cause des faibles rendements éthanologiques obtenus par cette levure.

De plus, ce travail aurait pu être complété en réalisant des cultures de levures sur hydrolysats enzymatiques des polymères modèles et des BLC en conditions anaérobies ou limitées en oxygène dans le but d'évaluer l'effet de ces conditions sur l'amélioration de la production éthanologique par les levures. Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser des co-cultures de levures : une fermentant les hexoses (*S. cerevisiae*) et l'autre fermentant le xylose (*S. shehatae*) sur hydrolysats enzymatiques du son de blé par exemple qui est riche en hémicelluloses.

Comme le prétraitement de la (ligno)cellulose aux LI, à basse température (35°C) a permis une amélioration des rendements d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanologique, l'évaluation de la faisabilité de combiner le prétraitement aux LI, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanologique selon un procédé « one-pot » serait une perspective intéressante à aborder.

D'une manière générale, l'une des perspectives importantes à envisager serait l'optimisation des conditions réactionnelles par des plans d'expérience factoriels, afin d'atteindre des rendements d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique plus élevés. Les paramètres réactionnels du prétraitement (couple température durée, charge initiale en substrat, teneur en LI, réutilisation des LI...) et de l'hydrolyse enzymatique (température, agitation, ratio enzymes/substrat, origine différente d'enzymes...) sont des approches à considérer dans ce sens. Par ailleurs, des criblages d'espèces et/ou de souches de levures (rendements éthanoliques, tolérance vis-à-vis des LI...), des différentes conditions de cultures (conditions aérobies, anaérobies, limitées en oxygène, milieu de culture, température, agitation) et des sources de carbone par des robots à haut débit, seraient également intéressants à mettre en œuvre. La finalité de l'optimisation de tous ces paramètres expérimentaux est de pouvoir transposer ce procédé de production de bioéthanol 2G à l'échelle industrielle. Par ailleurs, il est à souligner que le procédé du prétraitement aux LI peut être utilisé pour produire des sucres (hexoses et pentoses) par hydrolyse enzymatique, pouvant être valorisées en d'autres molécules d'intérêt que le bioéthanol.

Enfin, dans cette étude deux BLC ont été étudiées : le saule blanc et le son de blé désamidonné qui ne sont que deux exemples parmi une multitude d'autres mais représentatifs de filières distinctes. Différentes autres BLC pourraient être également abordées et optimisées comme par exemple des résidus de bois différents (résineux : pin, eucalyptus ou épicéa et autres feuillus que le saule : hêtre, peuplier, chêne...), des résidus agricoles (paille de blé, de riz, tiges de maïs, coques de graines de tournesol...), des cultures dédiées à croissance rapide (*Miscanthus*) ou aussi les déchets verts municipaux (tonte des pelouses, taille des haies...).

*Références  
Bibliographiques*

- Abbi, M., Kuhad, R.C. and Singh, A. (1996) Bioconversion of pentose sugars to ethanol by free and immobilized cells of *Candida shehatae* (NCL-3501): Fermentation behaviour. *Process Biochem.*, 31, 555–560.
- Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M. and Wenger, K.S. (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem.*, 41, 2333–2336.
- Aguilar-Uscanga, B. and François, J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 37, 268–274.
- Ajao, O., Jeaidi, J., Benali, M., Restrepo, A.M., El Mehdi, N. and Boumghar, Y. (2018) Quantification and Variability Analysis of Lignin Optical Properties for Colour-Dependent Industrial Applications. *Molecules*, 23, 377.
- Alexander, M.A., Yang, V.W. and Jeffries, T. W. (1988) Levels of pentose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* grown in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 282–288.
- Al-mhanna, M.N.M. (2010) Observation of crabtree effect and diauxic behaviour of yeast using absorption. *Chem. Eng. Trans.*, 21, 1465–1470.
- Alves, E.F., Bose, S.K., Francis, R.C., Colodette, J.L., Iakovlev, M. and Van Heiningen, A. (2010) Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. *Carbohydr. Polym.*, 82, 1097–1101.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, 101, 4851–4861.
- Amaya-Delgado, L., Flores-Cosío, G., Sandoval- Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Arrizon, J. and Gschaedler, A. (2018) Comparative of Lignocellulosic Ethanol Production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Spec. Top. Renew. Energy Syst.*
- Anderson, J.L., Ding, J., Welton, T. and Armstrong, D.W. (2002) Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 14247–14254.
- Antunes, F. A. F., Chandel, A.K., Milessi, T.S.S., Santos, J.C., Rosa, C.A. and Da Silva, S.S. (2014) Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by a Novel Brazilian Pentose Fermenting Yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of Fermentation Medium. *Int. J. Chem. Eng.*, 1–8.
- Antunes, F.A.F., Chandel, A.K., Brumano, L.P., Teran Hilaes, R., Peres, G.F.D., Ayabe, L.E.S., Sorato, V.S., Santos, J.R., Santos, J.C. and Da Silva, S.S. (2018) A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. *Renew. Energy*, 124, 189–196.
- Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., Novalin, S. and Kneifel, W. (2014) Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Sci. Technol.*, 56, 222–231.
- Arantes, V. and Saddler, J.N. (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol. Biofuels*, 3, 4.
- Araújo, J.D.P., Grande, C.A. and Rodrigues, A.E. (2010) Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. *Chem. Eng. Res. Des.*, 88, 1024–1032.
- Arnold, L.H. (2018) *Yeast Cell Envelopes Biochemistry Biophysics and Ultrastructure*, CRC Revivals Press.

- Arora, R., Manisseri, C., Li, C., Ong, M.D., Scheller, H.V., Vogel, K., Simmons, B.A. and Singh, S. (2010) Monitoring and Analyzing Process Streams Towards Understanding Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *BioEnergy Res.*, 3, 134–145.
- Auxenfans, T., Buchoux, S., Djellab, K., Avondo, C., Husson, E. and Sarazin, C. (2012) Mild pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic liquids towards one-batch process. *Carbohydr. Polym.*, 90, 805–813.
- Auxenfans, T., Buchoux, S., Husson, E. and Sarazin, C. (2014a) Efficient enzymatic saccharification of *Miscanthus*: Energy-saving by combining dilute acid and ionic liquid pretreatments. *Biomass Bioenergy*, 62, 82–92.
- Auxenfans, T., Buchoux, S., Larcher, D., Husson, G., Husson, E. and Sarazin, C. (2014b) Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: Recycled ionic liquids pretreatments. *Energy Convers. Manag.*, 88, 1094–1103.
- Auxenfans, T., Husson, E. and Sarazin, C. (2017) Simultaneous pretreatment and enzymatic saccharification of (ligno) celluloses in aqueous-ionic liquid media: A compromise. *Biochem. Eng. J.*, 117, 77–86.
- Azadi, P., Inderwildi, O.R., Farnood, R. and King, D.A. (2013) Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin : A critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 21, 506–523.
- B**adgujar, K.C. and Bhanage, B.M. (2015) Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. *Bioresour. Technol.*, 178, 2–18.
- Bai, F.W., Anderson, W.A. and Moo-Young, M. (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.*, 26, 89–105.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., Maris, A.J.A. van, Kötter, P., Luttk, M.A.H., Dijken, J.P. van and Pronk, J.T. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 15–37.
- Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manag.*, 52, 858–875.
- Balat, M., Balat, H. and Öz, C. (2008) Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 34, 551–573.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P. and Ballesteros, I. (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.*, 39, 1843–1848.
- Barnett, J.A. and Entian, K.-D. (2005) A history of research on yeasts 9 : regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22, 835–894.
- Barnett, J.A. and Robinow, C.F. (2002) A history of research on yeasts 4 : cytology part I, 1890–1950. *Yeast*, 19, 151–182.
- Barron, N., Marchant, R., McHale, L. and McHale, A.P. (1994) Growth of a thermotolerant ethanol-producing strain of *Kluyveromyces marxianus* on cellobiose containing media. *Biotechnol. Lett.*, 16, 625–630.
- Bataillon, M., Mathaly, P., Nunes Cardinali, A.-P. and Duchiron, F. (1998) Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale. *Ind. Crops Prod.*, 8, 37–43.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications : a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 326–338.
- Behera, S.S. and Ray, R.C. (2016) Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol.*, 86, 656–669.

- Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 257, 3018–3025.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S. and Saddler, J. (2006) Inhibition of cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.*, 125, 198–209.
- Bernardes, A., Pellegrini, V.O.A., Curtolo, F., Camilo, C.M., Mello, B.L., Johns, M.A., Scott, J.L., Guimaraes, F.E.C. and Polikarpov, I. (2019) Carbohydrate binding modules enhance cellulose enzymatic hydrolysis by increasing access of cellulases to the substrate. *Carbohydr. Polym.*, 211, 57–68.
- Biely, P. (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.*, 3, 286–290.
- Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M. and Kluepfel, D. (1997) Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families : differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.*, 57, 151–166.
- Binder, J.B. and Raines, R.T. (2010) Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 4516–4521.
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A. and Galzy, P. (1982) A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2031–2037.
- Bolen, P. L. and Detroy, R. W. (1985) Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose, or D-galactose. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 302–307.
- Bose, S., Armstrong, D.W. and Petrich, J.W. (2010) Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose in Ionic Liquids: A Green Approach Toward the Production of Biofuels. *J. Phys. Chem. B*, 114, 8221–8227.
- Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C. and Chabbert, B. (2011) Probing a family GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 72, 130–138.
- Bowman, S.M. and Free, S.J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28, 799–808.
- Brandt, A., Gräsvik, J., P. Hallett, J. and Welton, T. (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.*, 15, 550–583.
- Brillouet, J.-M. and Joseleau, J.-P. (1987) Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel. *Carbohydr. Res.*, 159, 109–126.
- Bruinenberg, P.M. (1986) The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 52, 411–429.
- Bruinenberg, P.M., de Bot, P.H.M., van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1984) NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 256–260.
- Buah, W.K., Cunliffe, A.M. and Williams, P.T. (2007) Characterization of Products from the Pyrolysis of Municipal Solid Waste. *Process Saf. Environ. Prot.*, 85, 450–457.
- Caffall, K.H. and Mohnen, D. (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 344, 1879–1900.
- Canilha, L., Almeida e Silva, J.B., Felipe, M.G.A. and Carvalho, W. (2003) Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. *Biotechnol. Lett.*, 25, 1811–1814.

- Cao, Y., Zhang, R., Cheng, T., Guo, J., Xian, M. and Liu, H. (2017) Imidazolium-based ionic liquids for cellulose pretreatment : recent progresses and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 521–532.
- Caputto, R., Leloir, L.F., Trucco, R.E., Cardini, C.E. and Paladini, A.C. (1949) The Enzymatic Transformation of Galactose into Glucose Derivatives. *J. Biol. Chem.*, 179, 497–498.
- Carlson, M. and Botstein, D. (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 28, 145–154.
- Chandel, A.K., Antunes, F.F.A., Anjos, V., Bell, M.J.V., Rodrigues, L.N., Singh, O.V., Rosa, C.A., Pagnocca, F.C. and Da Silva, S.S. (2013) Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, 6, 4.
- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A. and Kuhad, R.C. (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.*, 98, 1947–1950.
- Chandler, M., Stanley, G.A., Rogers, P. and Chambers, P. (2004) A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.*, 54, 427–454.
- Chang, V.S. and Holtzapple, M.T. (2000) Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. *App. Biochem. Biotechnol.*, 84, 5–37.
- Chin, R.M., Fu, X., Pai, M.Y., et al. (2014) The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 510, 397–401.
- Cho, H.M., Gross, A.S. and Chu, J.-W. (2011) Dissecting Force Interactions in Cellulose Deconstruction Reveals the Required Solvent Versatility for Overcoming Biomass Recalcitrance. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14033–14041.
- Cieniecka-Rosłonkiewicz, A., Pernak, J., Kubis-Feder, J., Ramani, A., J. Robertson, A. and R. Seddon, K. (2005) Synthesis, anti-microbial activities and anti-electrostatic properties of phosphonium-based ionic liquids. *Green Chem.*, 7, 855–862.
- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., Souza, L.M. de, Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C.A., Gorin, P.A.J., Sasaki, G.L. and Iacomini, M. (2006) A Polysaccharide from a Tea (*Infusion*) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with Anti-ulcer Protective Effects. *J. Nat. Prod.*, 69, 1018–1021.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 3–23.
- Corrêa, T.L.R., Santos, L.V. dos and Pereira, G.A.G. (2016) AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 9–16.
- Couturier, M., Ladevèze, S., Sulzenbacher, G., Ciano, L., Fanuel, M., Moreau, C., Villares, A., Cathala, B., Chaspoul, F., Frandsen, K. E., Labourel, A., Herpoël-Gimbert, I., Grisel, S., Haon, M., Lenfant, N., Rogniaux, H., Ropartz, D., Davies, G. J., Rosso, M.-N., Walton, P. H., Henrissat, B. and Berrin, J.-G. (2018) Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nat. Chem. Biol.*, 14, 306–310.
- Crosthwaite, J.M., Aki, S.N.V.K., Maginn, E.J. and Brennecke, J.F. (2005) Liquid phase behavior of imidazolium-based ionic liquids with alcohols: effect of hydrogen bonding and non-polar interactions. *Fluid Phase Equilibria*, 228–229, 303–309.
- Crowhurst, L., Falcone, R., Lancaster, N.L., Llopis-Mestre, V. and Welton, T. (2006) Using Kamlet–Taft Solvent Descriptors To Explain the Reactivity of Anionic Nucleophiles in Ionic Liquids. *J. Org. Chem.*, 71, 8847–8853.
- Crowhurst, L., R. Mawdsley, P., M. Perez-Arlandis, J., A. Salter, P. and Welton, T. (2003) Solvent – solute interactions in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 2790–2794.

- D**a Costa Lopes, A.M., João, K.G., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, E. and Bogel-Lukasik, R. (2013) Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. *Sustain. Chem. Process.*, 1, 3.
- Da Cruz, S.H., Batistote, M. and Ernandes, J.R. (2003) Effect of Sugar Catabolite Repression in Correlation with the Structural Complexity of the Nitrogen Source on Yeast Growth and Fermentation. *J. Inst. Brew.*, 109, 349–355.
- Dadi, A.P., Schall, C.A. and Varanasi, S. (2007) Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 137, 407–421.
- Dadi, A.P., Varanasi, S. and Schall, C.A. (2006) Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol. Bioeng.*, 95, 904–910.
- Darvill, A.G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 243–275.
- Das, S., Breunig, K.D. and Hollenberg, C.P. (1985) A positive regulatory element is involved in the induction of the beta-galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis*. *EMBO J.*, 4, 793–798.
- De Bruijne, A.W., Schuddemat, J., Van den Broek, P.J.A. and Van Steveninck, J. (1988) Regulation of sugar transport systems of *Kluyveromyces marxianus* : the role of carbohydrates and their catabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 939, 569–576.
- De Lorenzo, G. and Ferrari, S. (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 295–299.
- Deguchi, S., Mukai, S-a., Tsudome, M. and Horikoshi, K. (2006) Facile Generation of Fullerene Nanoparticles by Hand-Grinding. *Adv. Mater.*, 18, 729–732.
- Del Rio, L.F., Chandra, R.P. and Saddler, J.N. (2012) Fibre size does not appear to influence the ease of enzymatic hydrolysis of organosolv-pretreated softwoods. *Bioresour. Technol.*, 107, 235–242.
- Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.M. (1986) The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.*, 8, 897–900.
- Dellomonaco, C., Fava, F. and Gonzalez, R. (2010) The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb. Cell Fact.*, 9, 3.
- Demirbas, A. (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 31, 466–487.
- Deshpande, M.V. and Eriksson, K.-E. (1984) Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 338–340.
- Deutschmann, R and Dekker, R. F.H. (2012) From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnol. Adv.*, 30, 1627–1640.
- Dhawan, S. and Kaur, J. (2007) Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27, 197–216.
- Dickinson, J.R. (2004) *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*, Taylor & Francis, Ltd, London, Philadelphia.
- Dickinson, Q., Bottoms, S., Hinchman, Mcllwain, S., Li, S., Myers, L. C., Boone, C., Coon, J. J., Hebert, A., Sato, K. T., Landick, R. and Piotrowski, J. S. (2016) Mechanism of imidazolium ionic liquids toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and rational engineering of a tolerant, xylose-fermenting strain. *Microb. Cell Fact.*, 15, 17.
- Dickson, R.C. and Barr, K. (1983) Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, 154, 1245–1251.

- Dien, B.S., Kurtzman, C.P., Saha, B.C. and Bothast, R.J. (1996) Screening for l-arabinose fermenting yeasts. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57–58, 233.
- Docherty M. K. and Jr Kulpa, F. C. (2005) Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chem.*, 7, 185–189.
- Dodd, D. and Cann, I.K.O. (2009) Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, 1, 2–17.
- Doherty V. T., Mora-Pale, Foley, E. S., Linhardt, J. R. and Dordick, S. J. (2010) Ionic liquid solvent properties as predictors of lignocellulose pretreatment efficacy. *Green Chem.*, 12, 1967–1975.
- Dongowski, G. (2001) Enzymatic degradation studies of pectin and cellulose from red beets. *Food Nahr.*, 45, 324–331.
- Du Preez, J.C. (1994) Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 944–956.
- Du Preez, J.C., Bosch, M. and Prior, B.A. (1986) The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 228–233.
- Du Preez, J.C. and van der Walt, J.P. (1983) Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.*, 5, 357–362.
- Du Preez, J. C., van Driessel, B. and Prior, B.A. (1989a) D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnol. Lett.*, 11, 131–136.
- Du Preez, J. C., van Driessel, B. and Prior, B.A. (1989b) Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. *Arch. Microbiol.*, 152, 143–147.
- Dussán, K.J., Silva, D.D.V., Perez, V.H. and da Silva, S.S. (2016) Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew. Energy*, 87, 703–710.
- E**bringerová, A. and Heinze, T. (2000) Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.*, 21, 542–556.
- Ebringerová, A. and Hromádková, Z. (1999) Xylans of Industrial and Biomedical Importance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 16, 325–346.
- Eggeman, T. and Elander, R.T. (2005) Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.*, 96, 2019–2025.
- El-Ashmawy, A.E., Mobarak, F. and El-Kalyoubi, S. (1976) Hemicelluloses as additive in papermaking. III. Effect of hemicelluloses isolated from plant raw materials compared to the effect of those isolated from pulps on paper properties. *Cellul. Chem. Technol.*, 10, 637.
- Elgharbawy, A.A., Alam, M.Z., Moniruzzaman, M. and Goto, M. (2016) Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochem. Eng. J.*, 109, 252–267.
- Engel, P., Mladenov, R., Wulfhorst, H., Jäger, G. and Spiess, A.C. (2010) Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose. *Green Chem.*, 12, 1959–1966.

- F**iechter, A., Fuhrmann, G.F. and Käppeli, O. (1981) Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells. In A. H. Rose and J. G. Morris, eds. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 123–183.
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F. and Whitney, R.A. (2010) A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.*, 101, 8915–8922.
- Flores, C.-L., Rodríguez, C., Petit, T. and Gancedo, C. (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 507–529.
- Flores-Cosio, G., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A. and Amaya-Delgado, L. (2018) Physiological response to furan derivatives stress by *Kluyveromyces marxianus* SLP1 in ethanol production. *Rev. Mex. Ing. Quím.*, 17, 189–202.
- Fonseca, C., Romão, R., de Sousa, H.R., Hahn-Hägerdal, B. and Spencer-Martins, I. (2007) L-Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS J.*, 274, 3589–3600.
- Fonseca, G.G., de Carvalho, N.M.B. and Gombert, A.K. (2013) Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 5055–5067.
- Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. and Gombert, A.K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79, 339–354.
- Fort, D. A., Remsing, R. C., Swatloski, R. P., Moyna, P., Moyna, G. and Rogers, D., R. (2007) Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.*, 9, 63–69.
- Frandsen, K.E.H., Simmons, T.J., Dupree, P., Poulsen, J.-C. N., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Johnston, E. M., Tovborg, M., Johansen, K. S., von Freisleben, P., Marmuse, L., Fort, S., Cottaz, S., Driguez, H., Henrissat, N. L., Tuna, F., Baldansuren, A., Davies, G. J., Lo Leggio, L. and Walton, P. H. (2016) The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monoxygenases. *Nat. Chem. Biol.*, 12, 298–303.
- Freixo, M. R. and de Pinho, M. N. (2002) Enzymatic hydrolysis of beechwood xylan in a membrane reactor. *Desalination*, 149, 237–242.
- Freudenberger, R. (2009) *Alcohol Fuel: A Guide to Making and Using Ethanol as a Renewable Fuel*. 1st Ed. Canada: New Society Publishers.
- Frey, P.A. (1996) The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.*, 10, 461–470.
- Frick, O. and Wittmann, C. (2005) Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative <sup>13</sup>C flux analysis. *Microbial Cell Factories*, 4, 30.
- Fukaya, Y., Hayashi, K., Wada, M. and Ohno, H. (2008) Cellulose dissolution with polar ionic liquids under mild conditions: required factors for anions. *Green Chem.*, 10, 44–46.
- Fukumoto, K., Yoshizawa, M. and Ohno, H. (2005) Room Temperature Ionic Liquids from 20 Natural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2398–2399.
- G**albe, M. and Zacchi, G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 618–628.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 334–361.

- Ganske, F. and Bornscheuer, U.T. (2006) Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the Presence of the Ionic Liquids [BMIM][BF<sub>4</sub>] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] and Organic Solvents. *Biotechnol. Lett.*, 28, 465–469.
- Gao, W.-W., Zhang, F.-X., Zhang, G.-X. and Zhou, C.-H. (2015) Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. *Biochem. Eng. J.*, 99, 67–84.
- Geng, F., Zheng, L., Yu, L., Li, G. and Tung, C. (2010) Interaction of bovine serum albumin and long-chain imidazolium ionic liquid measured by fluorescence spectra and surface tension. *Process Biochem.*, 45, 306–311.
- Gericke, M., Liebert, T., Seoud, O.A.E. and Heinze, T. (2011) Tailored Media for Homogeneous Cellulose Chemistry: Ionic Liquid/Co-Solvent Mixtures. *Macromol. Mater. Eng.*, 296, 483–493.
- Gille, S. and Pauly, M. (2012) O-Acetylation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Front. Plant Sci.*, 3.
- Gillet, S., Aguedo, M., Petitjean, L., C. Morais, A.R., Lopes, A.M. da C., M. Łukasik, R. and T. Anastas, P. (2017) Lignin transformations for high value applications: towards targeted modifications using green chemistry. *Green Chem.*, 19, 4200–4233.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. and Bogel-Łukasik, R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.*, 101, 4775–4800.
- Gírio, F.M., Peito, M.A. and Amaral-Collaco, M.T. (1989) Enzymatic and physiological study of d-xylose metabolism by *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 199–204.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Mirakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Olivier, S. G. (1996) Life with 6000 Genes. *Science*, 274, 546–567.
- Gong, C.-S., Claypool, T.A., McCracken, L.D., Maun, C.M., Ueng, P.P. and Tsao, G.T. (1983) Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 85–102.
- Gonzalez, R.W., Treasure, T., Phillips, R.B., Jameel, H. and Saloni, D. (2011) Economics of cellulose ethanol production: green liquor pretreatment for softwood and hardwood, greenfield and repurpose scenarios. *BioResources*, 6, 2551-2567–2567.
- Gorke, J., Srienc, F. and Kazlauskas, R. (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 15, 40–53.
- Green, K.R. and Lowenbach, W.A. (2001) MTBE Contamination: Environmental, Legal, and Public Policy Challenges. *Environ. Forensics*, 2, 3–6.
- Gröndahl, M., Teleman, A. and Gatenholm, P. (2003) Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. *Carbohydr. Polym.*, 52, 359–366.
- Günan Yücel, H. and Aksu, Z. (2015) Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. *Fuel*, 158, 793–799.
- Gupta, R. and Lee, Y.Y. (2009) Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 102, 1570–1581.
- Gupta, R., Sharma, K.K. and Kuhad, R.C. (2009) Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresour. Technol.*, 100, 1214–1220.
- Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.-G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E.X.F. and Ezeji, T. (2016) Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends Biochem. Sci.*, 41, 633–645.

- H**a, S.-J., Galazka, J.M., Joong Oh, E., Kordić, V., Kim, H., Jin, Y.-S. and Cate, J.H.D. (2013) Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrin transporters. *Metab. Eng.*, 15, 134–143.
- Ha, S.-J., Galazka, J.M., Rin Kim, S., Choi, J.-H., Yang, X., Seo, J.-H., Louise Glass, N., Cate, J.H.D. and Jin, Y.-S. (2011) Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 504–509.
- Hadar, Y. (2013) Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol. In V. Faraco, ed. *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 21–38.
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M. and Ardjmand, M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 27, 77–93.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. and Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.*, 24, 549–556.
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realff, M.J. and Bommarius, A.S. (2011) Biological pretreatment of cellulose: Enhancing enzymatic hydrolysis rate using cellulose-binding domains from cellulases. *Bioresour. Technol.*, 102, 2910–2915.
- Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G. and PC Faaij, A. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass : techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*, 28, 384–410.
- Hansen, A. (2005) Ethanol–diesel fuel blends—a review. *Bioresour. Technol.*, 96, 277–285.
- Hari Krishna, S., Janardhan Reddy, T. and Chowdary, G.V. (2001) Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresour. Technol.*, 77, 193–196.
- Harris, P.V., Welner, D., McFarland, K.C., Re, E., Navarro Poulsen, J.-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., Xu, F., Cherry, J., Larsen, S. and Lo Leggio, L. (2010) Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry (Mosc.)*, 49, 3305–3316.
- Hassan, E.-S.R.E., Mutelet, F. and Bouroukba, M. (2015) Experimental and theoretical study of carbohydrate–ionic liquid interactions. *Carbohydr. Polym.*, 127, 316–324.
- Hasunuma, T. and Kondo, A. (2012) Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochem.*, 47, 1287–1294.
- Hauru, L.K.J., Hummel, M., King, A.W.T., Kilpeläinen, I. and Sixta, H. (2012) Role of Solvent Parameters in the Regeneration of Cellulose from Ionic Liquid Solutions. *Biomacromolecules*, 13, 2896–2905.
- Hayes, D.J. (2009) An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catal. Today*, 145, 138–151.
- Hemsworth, G.R., Henrissat, B., Davies, G.J. and Walton, P.H. (2014) Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monoxygenases. *Nat. Chem. Biol.*, 10, 122–126.
- Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 100, 10–18.
- Henrissat, B., Teeri, T. and Warren, R. A. (1998) A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.*, 425, 352–354.
- Hernández-Fernández, F.J., de los Ríos, A.P., Tomás-Alonso, F., Gómez, D. and Villora, G. (2009) Stability of hydrolase enzymes in ionic liquids. *Can. J. Chem. Eng.*, 87, 910–914.

- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, 52, 536–553.
- Himmel, M.E. (2009) *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Holbrey, J.D. and Seddon, K.R. (1999) The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 0, 2133–2140.
- Holden, H.M., Rayment, I. and Thoden, J.B. (2003) Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *J. Biol. Chem.*, 278, 43885–43888.
- Holladay, J.E., White, J.F., Bozell, J.J. and Johnson, D. (2007) Top Value-Added Chemicals from Biomass - Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin, Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States).
- Hon, D.N.-S. and Shiraishi, N. (2000) *Wood and Cellulosic Chemistry, Second Edition, Revised, and Expanded*, CRC Press.
- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S., Yang, G. and Jönsson, L.J. (2012) Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 104, 503–508.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. and Eijsink, V. (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels*, 5, 45.
- Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., Gourlay, K. and Saddler, J.N. (2014) Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ. Sci.*, 7, 2308–2315.
- Huddleston, G. J, Visser, E. A., Reichert Matthew, W., Willauer, H. D., Broker, A. G. and Rogers, R. D. (2001) Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.*, 3, 156–164.
- Hurley, F.H. and Wler, T.P. (1951) The Electrodeposition of Aluminum from Nonaqueous Solutions at Room Temperature. *J. Electrochem. Soc.*, 98, 207–212.
- Husson, E., Buchoux, S., Avondo, C., Cailleu, D., Djellab, K., Gosselin, I., Wattraint, O. and Sarazin, C. (2011) Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses: Contribution of CP-MAS 13C NMR and SEM. *Bioresour. Technol.*, 102, 7335–7342.
- Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I. and Chevalot, I. (2008) Chemo-selectivity of the N, O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 55, 110–117.
- Husson, E., Murrieta-Pazos I., Ducatel, H., Ravot, G. and Sarazin, C. (2018) Biomass treatment method. Brevet : WO 2018/130776 A1.
- I**brahim, M.M., Agblevor, F.A. and El-Zawawy, W.K. (2010) Isolation and characterization of cellulose and lignin from steam-exploded lignocellulosic biomass. *BioResources*, 5, 397–418.
- Inokuma, K., Ishii, J., Hara, K.Y., Mochizuki, M., Hasunuma, T. and Kondo, A. (2015) Complete Genome Sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a Nonconventional Thermotolerant Yeast. *Genome Announc.*, 3, e00389-15.
- Iwatake, A., Nogi, M. and Yano, H. (2008) Cellulose nanofiber-reinforced polylactic acid. *Compos. Sci. Technol.*, 68, 2103–2106.

- J**acobson, J.L. (2006) Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures, Springer Science & Business Media.
- Jacoby, J., Hollenberg, C.P. and Heinisch, J.J. (1993) Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Mol. Microbiol.*, 10, 867–876.
- Jaeger, V.W. and Pfaendtner, J. (2013) Structure, Dynamics, and Activity of Xylanase Solvated in Binary Mixtures of Ionic Liquid and Water. *ACS Chem. Biol.*, 8, 1179–1186.
- Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Imran, M., Jacquot, M. and Desobry, S. (2010) Poly-Lactic Acid : Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 9, 552–571.
- Jeffries, T.W. (1981) Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. *Biotechnol. Lett.*, 3, 213–218.
- Jeffries, T.W. (1983) Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In *Pentoses and Lignin. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–32.
- Jeffries, T.W. and Sreenath, H.K. (1988) Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures by *Candida shehatae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 502–506.
- Jeffries, T.W. and Van Vleet, J.R.H. (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.*, 9, 793–807.
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.-S., Passoth, V. and Richardson, P. M. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.*, 25, 319–326.
- Johnston, M. (1999) Feasting, fasting and fermenting: glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.*, 15, 29–33.
- Jones, P.O. and Vasudevan, P.T. (2010) Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase. *Biotechnol. Lett.*, 32, 103.
- Jørgensen, U. (2011) Benefits versus risks of growing biofuel crops : the case of *Miscanthus*. *Curr. Opin. Environ. Sustain.*, 3, 24–30.
- K**ádár, Z., Szengyel, Z. and Réczey, K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crops Prod.*, 20, 103–110.
- Kamiya, N., Matsushita, Y., Hanaki, M., Nakashima, K., Narita, M., Goto, M. and Takahashi, H. (2008) Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media. *Biotechnol. Lett.*, 30, 1037.
- Käppeli, O. (1987) Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. In A. H. Rose and D. W. Tempest, eds. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 181–209.
- Kar, Y. and Deveci, H. (2006) Importance of P-Series Fuels for Flexible-Fuel Vehicles (FFVs) and Alternative Fuels. *Energy Sources Part Recovery Util. Environ. Eff.*, 28, 909–921.
- Karatzos, S.K., Edey, L.A. and Wellard, R.M. (2012) The undesirable acetylation of cellulose by the acetate ion of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Cellulose*, 19, 307–312.
- Kardošová, A., Malovíková, A., Pätoprstý, V., Nosál'ová, G. and Matáková, T. (2002) Structural characterization and antitussive activity of a glucuronoxylan from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Carbohydr. Polym.*, 47, 27–33.

- Karimi, K., Emtiazi, G. and Taherzadeh, M.J. (2006) Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 138–144.
- Katahira, S., Mizuike, A., Fukuda, H. and Kondo, A. (2006) Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellobiosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 1136–1143.
- Kaya, F., Heitmann, J.A. and Joyce, T.W. (2000) Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. *J. Biotechnol.*, 80, 241–247.
- Keegstra, K. (2010) Plant Cell Walls. *Plant Physiology*, 154, 483–486.
- Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D. and Albersheim, P. (1973) The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components. *Plant Physiol.*, 51, 188–197.
- Keshwani, D.R. and Cheng, J.J. (2009) Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresour. Technol.*, 100, 1515–1523.
- Kilpeläinen, I., Xie, H., King, A., Granstrom, M., Heikkinen, S. and Argyropoulos, D.S. (2007) Dissolution of Wood in Ionic Liquids. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9142–9148.
- Kim, J.-H., Block, D.E. and Mills, D.A. (2010) Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88, 1077–1085.
- Kim, S. and Dale, E. B. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*, 26, 361–375.
- Kim, S.J., Kim, M.Y., Jeong, S.J., Jang, M.S. and Chung, I.M. (2012) Analysis of the biomass content of various *Miscanthus* genotypes for biofuel production in Korea. *Ind. Crops Prod.*, 38, 46–49.
- Kitamura, S., Hori, T., Kurita, K., Takeo, K., Hara, C., Itoh, W., Tabata, K., Elgsaeter, A. and Stokke, B.T. (1994) An antitumor, branched (1 → 3) - $\beta$ -d-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carbohydr. Res.*, 263, 111–121.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B. and Ahring, B.K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 10–26.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 239–256.
- Klyosov, A.A. (1990) Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry (Mosc.)*, 29, 10577–10585.
- Köhler, S., Liebert, T., Schöbitz, M., Schaller, J., Meister, F., Günther, W. and Heinze, T. (2007) Interactions of Ionic Liquids with Polysaccharides 1. Unexpected Acetylation of Cellulose with 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate. *Macromol. Rapid Commun.*, 28, 2311–2317.
- Koppram, R., Nielsen, F., Albers, E., Lambert, A., Wännström, S., Welin, L., Zacchi, G. and Olsson, L. (2013) Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. *Biotechnol. Biofuels*, 6, 2.
- Kosan, B., Michels, C. and Meister, F. (2008) Dissolution and forming of cellulose with ionic liquids. *Cellulose*, 15, 59–66.
- Kragl, U., Eckstein, M. and Kaftzik, N. (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 565–571.

- Kulicke, W.-M., Lettau, A.I. and Thielking, H. (1997) Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)- $\beta$ -d-glucans. *Carbohydr. Res.*, 297, 135–143.
- Kumar, R., Singh, S., and Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass : biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 377–391.
- Kupiainen, L., Ahola, J. and Tanskanen, J. (2014) Kinetics of Formic Acid-catalyzed Cellulose Hydrolysis. *BioResources*, 9, 2645-2658–2658.
- Kurtzman, C.P. (1983) Biology and physiology of the d-xylose fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. In *Pentoses and Lignin. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 73–83.
- Kurtzman, C.P. and Dien, B.S. (1998) *Candida arabinofermentans*, a new L-arabinose fermenting yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74, 237–243.
- Labbé, N., Kline, L.M., Moens, L., Kim, K., Kim, P.C. and Hayes, D.G. (2012) Activation of lignocellulosic biomass by ionic liquid for biorefinery fractionation. *Bioresour. Technol.*, 104, 701–707.
- Lagaert, S., Beliën, T. and Volckaert, G. (2009) Plant cell walls : Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20, 1064–1073.
- Laplace, J.M., Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.M. (1991) Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* : oxygen requirement as a key factor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 158–162.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H. and Dale, B.E. (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 124, 1081–1099.
- Lee, J.W., Kim, J.Y., Jang, H.M., Lee, M.W. and Park, J.M. (2015) Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover : Sugar recovery efficiency and structural characterization. *Bioresour. Technol.*, 182, 296–301.
- Lee, S.H., Doherty, T.V., Linhardt, R.J. and Dordick, J.S. (2009) Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 102, 1368–1376.
- Lee, S.-M., Chang, W.-J., Choi, A.-R. and Koo, Y.-M. (2005) Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean J. Chem. Eng.*, 22, 687–690.
- Lee, W.-J., Kim, M.-D., Ryu, Y.-W., Bisson, L. and Seo, J.-H. (2002) Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 186–191.
- Lei, F., Rotbøll, M. and Jørgensen, S.B. (2001) A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 88, 205–221.
- Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Limtong, S., Thanonkeo, P. and Yamada, M. (2007) Comparison of the Gene Expression Patterns of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* and Their Physiological Functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1170–1182.
- Levine, S.E., Fox, J.M., Blanch, H.W. and Clark, D.S. (2010) A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 107, 37–51.
- Levy, I. and Shoseyov, O. (2002) Cellulose-binding domains : Biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.*, 20, 191–213.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E. and Christou, M. (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy*, 25, 335–361.

- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H.V., Auer, M., Vogel, K.P., Simmons, B.A. and Singh, S. (2010) Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.*, 101, 4900–4906.
- Li, C., Zhao, X., Wang, A., Huber, G.W. and Zhang, T. (2015) Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chem. Rev.*, 115, 11559–11624.
- Li, H., Kankaanpää, A., Xiong, H., Hummel, M., Sixta, H., Ojamo, H. and Turunen, O. (2013) Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulfide bridge and the effect of ionic liquid [emim]OAc on the enzymatic performance. *Enzyme Microb. Technol.*, 53, 414–419.
- Li, Q., He, Y.-C., Xian, M., Jun, G., Xu, X., Yang, J.-M. and Li, L.-Z. (2009) Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 100, 3570–3575.
- Li, S., Zhang, X. and Andresen, J.M. (2012) Production of fermentable sugars from enzymatic hydrolysis of pretreated municipal solid waste after autoclave process. *Fuel*, 92, 84–88.
- Li, W., Sun, N., Stoner, B., Jiang, X., Lu, X. and D. Rogers, R. (2011) Rapid dissolution of lignocellulosic biomass in ionic liquids using temperatures above the glass transition of lignin. *Green Chem.*, 13, 2038–2047.
- Liao, H., Sun, S., Wang, P., Bi, W., Tan, S., Wei, Z., Wei, Z., Mei, X., Liu, D., Raza, W., Shen, Q. and Xu, Y. (2014) A new acidophilic endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 1071–1083.
- Liao, W., Wen, Z., Hurley, S., Liu, Y., Liu, C. and Chen, S. (2005) Effects of Hemicellulose and Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose from Dairy Manure. In B. H. Davison, B. R. Evans, M. Finkelstein, and J. D. McMillan, eds. *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. ABAB Symposium. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 1017–1030.
- Lienqueo, M.E., Ravanal, M.C., Pezoa-Conte, R., Cortínez, V., Martínez, L., Niklitschek, T., Salazar, O., Carmona, R., García, A., Hyvärinen, S., Mäki-Arvela, P. and Mikkola, J.P. (2016) Second generation bioethanol from *Eucalyptus globulus* Labill and *Nothofagus pumilio* : Ionic liquid pretreatment boosts the yields. *Ind. Crops Prod.*, 80, 148–155.
- Ligthelm, M.E., Prior, B.A. and du Preez, J.C. (1988) The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of d-xylose and d-glucose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 63–68.
- Limayem, A. and Ricke, S.C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 38, 449–467.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. and Kong, H. (2012) Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass Bioenergy*, 47, 395–401.
- Lindman, B., Karlström, G. and Stigsson, L. (2010) On the mechanism of dissolution of cellulose. *J. Mol. Liq.*, 156, 76–81.
- Litsanov, B., Brocker, M. and Bott, M. (2012) Toward Homosuccinate Fermentation: Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Anaerobic Production of Succinate from Glucose and Formate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 3325–3337.
- Liu, H., Sale, K.L., Holmes, B.M., Simmons, B.A. and Singh, S. (2010a) Understanding the Interactions of Cellulose with Ionic Liquids: A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B*, 114, 4293–4301.
- Liu, Z., Ying, Y., Li, F., Ma, C. and Xu, P. (2010b) Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 495–501.

- Liu, L.-P., Zong, M.-H., Linhardt, R.J., Lou, W.-Y., Li, N., Huang, C. and Wu, H. (2016a) Mechanistic insights into the effect of imidazolium ionic liquid on lipid production by *Geotrichum fermentans*. *Biotechnol. Biofuels*, 9, 266.
- Liu, Z., Ho, S.-H., Hasunuma, T., Chang, J.-S., Ren, N.-Q. and Kondo, A. (2016b) Recent advances in yeast cell-surface display technologies for waste biorefineries. *Bioresour. Technol.*, 215, 324–333.
- Liu, Y.-S., Zeng, Y., Luo, Y., Xu, Q., Himmel, M.E., Smith, S.J. and Ding, S.-Y. (2009) Does the cellulose-binding module move on the cellulose surface? *Cellulose*, 16, 587–597.
- Lo Leggio, L., Simmons, T.J., Poulsen, J.-C.N., Frandsen, K.E.H., Hemsworth, G.R., Stringer, M.A., von Freiesleben, P., Tovborg, M., Johansen, K.S., De maria, L., Harris, P.V., Soong, C.-L., Dupree, P., Tryfona, T., Lenfant, N., Henrissat, B., Davies, G.J. and Walton, P.H. (2015) Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nat. Commun.*, 6, 5961.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M. and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 42, D490–D495.
- Lucas, C. and van Uden, N. (1986) Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 491–495.
- Lupoi, J.S., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B.A. and Henry, R.J. (2015) Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 49, 871–906.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. and Pretorius, I. S. (2002) *Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 506–577.
- M**Maes, C. and Delcour, J.A. (2001) Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. *J. Cereal Sci.*, 34, 29–35.
- Magasanik, B. (1961) Catabolite Repression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26, 249–256.
- Magee, R.J. and Kosaric, N. (1985) Bioconversion of hemicelluloses. In *Agricultural Feedstock and Waste Treatment and Engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 61–93.
- Magnuson, D.K., Bodley, J.W. and Evans, D.F. (1984) The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate. *J. Solut. Chem.*, 13, 583–587.
- Maki, M., Leung, K. T. and Qin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.*, 5, 500–516.
- Mäki-Arvela, P., Anugwom, I., Virtanen, P., Sjöholm, R. and Mikkola, J.P. (2010) Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids—A review. *Ind. Crops Prod.*, 32, 175–201.
- Maleszka, R., Wang, P. Y. and Schneider, H. (1982) Yeasts that ferment D-cellobiose as well as D-xylose. *Biotechnol. Lett.*, 4, 133–136.
- Mansfield, S.D., Mooney, C. and Saddler, J.N. (1999) Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.*, 15, 804–816.
- Margaritis, A. and Bajpai, P. (1982) Direct Fermentation of d-Xylose to Ethanol by *Kluyveromyces marxianus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1039–1041.
- Mazeau, K. and Heux, L. (2003) Molecular Dynamics Simulations of Bulk Native Crystalline and Amorphous Structures of Cellulose. *J. Phys. Chem.*, 107, 2394–2403.
- McKendry, P. (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour. Technol.*, 83, 37–46.

- McMillan, J.D. and Boynton, B.L. (1994) Arabinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 45–46, 569–584.
- Medronho, B. and Lindman, B. (2014) Competing forces during cellulose dissolution : From solvents to mechanisms. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 19, 32–40.
- Medronho, B. and Lindman, B. (2015) Brief overview on cellulose dissolution/regeneration interactions and mechanisms. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 222, 502–508.
- Mehmood, N., Alayoubi, R., Husson, E., Jacquard, C., Büchs, J., Sarazin, C. and Gosselin, I. (2018) *Kluyveromyces marxianus*, an Attractive Yeast for Ethanolic Fermentation in the Presence of Imidazolium Ionic Liquids. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 887.
- Mehmood, N., Husson, E., Jacquard, C., Wewetzer, S., Büchs, J., Sarazin, C. and Gosselin, I. (2015) Impact of two ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate, on *Saccharomyces cerevisiae*: metabolic, physiologic, and morphological investigations. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 17.
- Mello, B.L. and Polikarpov, I. (2014) Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. *AMB Express*, 4, 36.
- Menon, V. and Rao, M. (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 38, 522–550.
- Meunier-Goddik, L. and Penner, M.H. (1999) Enzyme-Catalyzed Saccharification of Model Celluloses in the Presence of Lignocellulosic Residues. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 346–351.
- Michelin, M., Ximenes, E., de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, M. and Ladisch, M.R. (2016) Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. *Bioresour. Technol.*, 199, 275–278.
- Miyafuji, H., Miyata, K., Saka, S., Ueda, F. and Mori, M. (2009) Reaction behavior of wood in an ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride. *J. Wood Sci.*, 55, 215–219.
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A. and Rodrigues, K.F. (2017) Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Rep.*, 10, 52–61.
- Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N. and Goto, M. (2010) Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochem. Eng. J.*, 48, 295–314.
- Mora-Pale, M., Meli, L., Doherty, T.V., Linhardt, R.J. and Dordick, J.S. (2011) Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 1229–1245.
- Moreira, L. R. S. and Filho, E. X. F. (2016) Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 5205–5214.
- Moreira, L. R. S., Campos, M. C., Siqueira, P. H. V. M., Silva, L. P., Ricart, C. A. O., Martins, P. A., Queiroz, R. M. L. and Filho, E. X. F. (2013) Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet. Biol.*, 60, 46–52.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M. and Ladisch, M.R. (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.*, 96, 1986–1993.
- Moyer, P., Kim, K., Abdoulmoumine, N., Chmely, S.C., Long, B.K., Carrier, D.J. and Labbé, N. (2018) Structural changes in lignocellulosic biomass during activation with ionic liquids comprising 3-methylimidazolium cations and carboxylate anions. *Biotechnol. Biofuels*, 11, 265.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. and Roberto, I.C. (2008) Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.*, 43, 124–129.

- N**agarajan, S., Skillen, N.C., Irvine, J.T.S., Lawton, L.A. and Robertson, P.K.J. (2017) Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 77, 182–192.
- Najafpour, G., Younesi, H. and Syahidah Ku Ismail, K. (2004) Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.*, 92, 251–260.
- Naushad, M., AlOthman, Z.A., Khan, A.B. and Ali, M. (2012) Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 51, 555–560.
- Navarro, A.R., C. Sepúlveda, M. del and Rubio, M.C. (2000) Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Manag.*, 20, 581–585.
- Nelson, M.L. and O'Connor, R.T. (1964) Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.*, 8, 1311–1324.
- Nguyen, T.H., Fleet, G.H. and Rogers, P.L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 206–212.
- Nigam, P.S. and Singh, A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 37, 52–68.
- Nimlos, M.R., Beckham, G.T., Matthews, J.F., Bu, L., Himmel, M.E. and Crowley, M.F. (2012) Binding Preferences, Surface Attachment, Diffusivity, and Orientation of a Family 1 Carbohydrate-binding Module on Cellulose. *J. Biol. Chem.*, 287, 20603–20612.
- Norberg, I., Nordström, Y., Drougge, R., Gellerstedt, G. and Sjöholm, E. (2013) A new method for stabilizing softwood kraft lignin fibers for carbon fiber production. *J. Appl. Polym. Sci.*, 128, 3824–3830.
- Noritomi, H., Minamisawa, K., Kamiya, R. and Kato, S. (2011) Thermal stability of proteins in the presence of aprotic ionic liquids. *J. Biomed. Sci. Eng.*, 04, 94–99.
- Ntaikou, I., Gavala, H.N., Kornaros, M. and Lyberatos, G. (2008) Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *Int. J. Hydrog. Energy*, 33, 1153–1163.
- O**Neill, M., Albersheim, P. and Darvill, A. (1990) The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls. In Dey D. M. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry. Carbohydrates*. Academic Press, 2, 415–441.
- Ohara, H. (2003) Biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 474–477.
- Oksman, K., Skrifvars, M. and Selin, J.-F. (2003) Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Compos. Sci. Technol.*, 63, 1317–1324.
- Olivier-Bourbigou, H., Magna, L. and Morvan, D. (2010) Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Appl. Catal. Gen.*, 373, 1–56.
- Olofsson, K., Bertilsson, M. and Lidén, G. (2008a) A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels*, 1, 7.
- Olofsson, K., Rudolf, A. and Lidén, G. (2008b) Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 134, 112–120.
- Örmeci, B. and Vesilind, P.A. (2000) Development of an improved synthetic sludge: a possible surrogate for studying activated sludge dewatering characteristics. *Water Res.*, 34, 1069–1078.
- Osmond, C.B. and Ap Rees, T. (1969) Control of the pentose-phosphate pathway in yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, 184, 35–42.

- Osumi, M. (1998) The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. *Micron*, 29, 207–233.
- Ouellet, M., Datta, S., Dibble, D.C., Tamrakar, P.R., Benke, P.I., Li, C., Singh, S., Sale, K.L., Adams, P.D., Keasling, J.D., Simmons, B.A., Holmes, B.M. and Mukhopadhyay, A. (2011) Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production. *Green Chem.*, 13, 2743–2749.
- Özcan, S. and Johnston, M. (1999) Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 554–569.
- Özcan, S., Vallier, L.G., Flick, J.S., Carlson, M. and Johnston, M. (1997) Expression of the SUC2 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* is Induced by Low Levels of Glucose. *Yeast*, 13, 127–137.
- P**almarola-Adrados, B., Chotěborská, P., Galbe, M. and Zacchi, G. (2005) Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresour. Technol.*, 96, 843–850.
- Pan, X., Gilkes, N. and Saddler, J.N. (2006) Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung*, 60, 398–401.
- Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D.J. and Saddler, J.N. (2005) Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content. *Appl. Biochem. Biotechnol. Part A. Enzyme Eng. Biotechnol.* 124, 1069–1079.
- Pandey, M.P. and Kim, C.S. (2011) Lignin Depolymerization and Conversion : A Review of Thermochemical Methods. *Chem. Eng. Technol.*, 34, 29–41.
- Pang, S.C., Voon, L.K. and Chin, S.F. (2018) Controlled Depolymerization of Cellulose Fibres Isolated from Lignocellulosic Biomass Wastes. *Int. J. Polym. Sci.*, 1–11.
- Pannala, V.R., Bhat, P.J., Bhartiya, S. and Venkatesh, K.V. (2010) Systems biology of GAL regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2, 98–106.
- Parekh, S. and Wayman, M. (1986) Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.*, 8, 597–600.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A. and Johnson, D.K. (2010) Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels*, 3, 10.
- Parthasarathi, R., Sun, J., Dutta, T., Sun, N., Pattathil, S., konda, N. V. S. N. M., Peralta, A. G., Simmons, B. A. and Singh, S. (2016) Activation of lignocellulosic biomass for higher sugar yields using aqueous ionic liquid at low severity process conditions. *Biotechnol. Biofuels*, 9, 160.
- Pawar, P. M-A., Koutaniemi, S., Tenkanen, M., and Mellerowicz, E. J. (2013) Acetylation of woody lignocellulose : significance and regulation. *Front. Plant Sci.*, 4, 118.
- Pawar, R., Jadhav, W., Bhusare, S., Borade, R., Farber, S., Itzkowitz, D. and Domb, A. (2008) 1 - Polysaccharides as carriers of bioactive agents for medical applications. In R. L. Reis, N. M. Neves, J. F. Mano, M. E. Gomes, A. P. Marques, and H. S. Azevedo, eds. *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, pp. 3–53.
- Peciulyte, A., Karlström, K., Larsson, P.T. and Olsson, L. (2015) Impact of the supramolecular structure of cellulose on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 56.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F. and Sun, R-C. (2012) Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.*, 30, 879–903.
- Pereira, C., Silva, R.D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M.J. and Côrte-Real, M. (2008) Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, 1783, 1286–1302.

- Pernak, J., Sobaszekiewicz, K. and Mirska, I. (2003) Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chem.*, 5, 52–56.
- Persson, M. and Bornscheuer, U.T. (2003) Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 22, 21–27.
- Pfruender, H., Amidjojo, M., Kragl, U. and Weuster-Botz, D. (2004) Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 4529–4531.
- Pham, T.P.T., Cho, C.-W. and Yun, Y.-S. (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res.*, 44, 352–372.
- Philippidis, G.P. and Smith, T.K. (1995) Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 51–52, 117–124.
- Phitsuwan, P., Sakka, K., and Ratanakhanokchai, K. (2013) Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass Bioenergy*, 58, 390–405.
- Pimentel, D. (2003) Ethanol Fuels : Energy Balance, Economics, and Environmental Impacts Are Negative. *Nat. Resour. Res.*, 12, 127–134.
- Pinto, R., Moreira, S., Mota, M. and Gama, M. (2004) Studies on the Cellulose-Binding Domains Adsorption to Cellulose. *Langmuir*, 20, 1409–1413.
- Plechkova V. N. and Seddon, R. K. (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 123–150.
- Poletto, M., Pistor, V. and Zattera, A.J. (2013) Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. In *Cellulose-fundamental aspects*. IntechOpen.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S. and Monti, R. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 577–591.
- Ponnusamy, V.K., Nguyen, D.D., Dharmaraja, J., Shobana, S., Banu, J.R., Saratale, R.G., Chang, S.W. and Kumar, G. (2019) A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour. Technol.*, 271, 462–472.
- Popa, V. I. (1996). Hemicelluloses. In S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides in medicinal applications* (pp. 107–124). New York: Dekker.
- Popescu, C.-M., Singurel, G., Popescu, M.-C., Vasile, C., Argyropoulos, D.S. and Willför, S. (2009) Vibrational spectroscopy and X-ray diffraction methods to establish the differences between hardwood and softwood. *Carbohydr. Polym.*, 77, 851–857.
- Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C. (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recycl.*, 50, 1–39.
- Prior, B.A., Kilian, S.G. and Du Preez, J.C. (1989) Fermentation of smallcap<sup>3</sup>D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Process Biochem.*, 24, 21–32.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y. and van Dijken, J.P. (1996) Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1607–1633.
- Prückler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, C., Schmid, E. and Kneifel, W. (2014) Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT - Food Sci. Technol.*, 56, 211–221.

Quijano, G., Couvert, A. and Amrane, A. (2010) Ionic liquids : Applications and future trends in bioreactor technology. *Bioresour. Technol.*, 101, 8923–8930.

Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.-C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jørgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C. P., Dupree, P., Xu, F., Davies, G. J. and Walton, P. H. (2011) Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 15079–15084.

Qureshi, N., Saha, B.C., Dien, B., Hector, R.E. and Cotta, M.A. (2010) Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues : Part I – Use of barley straw hydrolysate. *Biomass Bioenergy*, 34, 559–565.

Rabinovich, M.L., Melnick, M.S. and Bolobova, A.V. (2002) The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes. *Biochem. Mosc.*, 67, 850–871.

Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczobutt, J., Hoffmann, J., Ondruschka, B., Filser, J. and Jastorff, B. (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 58, 396–404.

Ratledge, C. (1991) Yeast physiology — a micro-synopsis. *Bioprocess Eng.*, 6, 195–203.

Remsing, C. R., Swatloski, P. R., Rogers, D. R. and Moyna, G. (2006) Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride : a <sup>13</sup>C and <sup>35/37</sup>Cl NMR relaxation study on model systems. *Chem. Commun.*, 0, 1271–1273.

Ridley, L. B., O'Neill, A. M. and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.*, 57, 929–967.

Riley, R., Haridas, S., Wolfe, K.H., Lopes, M.R., Hittinger, C.T., Göker, M., Salamov, A.A., Wisecaver, J.H., Long, T.M., Calvey, C.H., Aerts, A.L., Barry, K.W., Choi, C., Clum, A., Coughlan, A.Y., Deshpande, S., Douglass, A.P., Hanson, S.J., Klenk, H.-P., LaButti, K.M., et al. (2016) Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 9882–9887.

Rizzi, M., Klein, C., Schulze, C., Bui-Thanh, N.-A. and Dellweg, H. (1989) Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 509–514.

Robinson, J. and Osteryoung, R.A. (1979) An electrochemical and spectroscopic study of some aromatic hydrocarbons in the room temperature molten salt system aluminum chloride-n-butylpyridinium chloride. *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 323–327.

Rosillo-Calle, F. and Walter, A. (2006) Global market for bioethanol : historical trends and future prospects. *Energy Sustain. Dev.*, 10, 20–32.

Rouhollah, H., Iraj, N., Giti, E. and Sorah, A. (2007) Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 1110–1114.

Ryabova, O.B., Chmil, O.M. and Sibirny, A.A. (2003) Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.*, 4, 157–164.

Rye, C.S. and Withers, S.G. (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 573–580.

Ryu, K. and Kim, Y. (1998) Adsorption of a xylanase purified from Pulpzyme HC onto alkali-lignin and crystalline cellulose. *Biotechnol. Lett.*, 20, 987–990.

Ryu, S., Labbé, N. and Trinh, C.T. (2015) Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose in ionic liquid for efficient production of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 4237–4244.

- Sadaf, A., Morya, V. K. and Khare, S. k. (2016) Applicability of *Sporotrichum thermophile* xylanase in the in situ saccharification of wheat straw pre-treated with ionic liquids. *Process Biochem.*, 51, 2090–2096.
- Saha, B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 279–291.
- Saini, J.K., Saini, R. and Tewari, L. (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5, 337–353.
- Salvador, C., Santos, da C. M. and Saraiva, A. J. (2010) Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase. *Green Chem.*, 12, 632–635.
- Sánchez, Ó.J. and Cardona, C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 99, 5270–5295.
- Sandoval-Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., Arrizon, J. and Amaya-Delgado, L. (2018) A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Clean Technol. Environ. Policy*, 20, 1491–1499.
- Sassner, P., Galbe, M. and Zacchi, G. (2008) Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy*, 32, 422–430.
- Saxena, R.C., Adhikari, D.K. and Goyal, H.B. (2009) Biomass-based energy fuel through biochemical routes : A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13, 167–178.
- Scheller, H.V. and Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 263–289.
- Schneider, H., Maleszka, R., Neirinck, L., Veliky, I.A., Wang, P.Y. and Chan, Y.K. (1983) Ethanol production from d-xylose and several other carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and other yeasts. In *Pentoses and Lignin. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 27, 57–71.
- Scullin, C., Cruz, A. G., Chuang, Y-De., Simmons, B. A., Loque, D. and Singh, S. (2015) Restricting lignin and enhancing sugar deposition in secondary cell walls enhances monomeric sugar release after low temperature ionic liquid pretreatment. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 95.
- Sellick, C.A., Campbell, R.N. and Reece, R.J. (2008) Chapter 3 Galactose Metabolism in Yeast—Structure and Regulation of the Leloir Pathway Enzymes and the Genes Encoding Them. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 269, 111–150.
- Senatham, S., Chamduang, T., Kaewchingduang, Y., Thammasittirong, A., Srisodsuk, M., Elliston, A., Roberts, I.N., Waldron, K.W. and Thammasittirong, S.N.-R. (2016) Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. *SpringerPlus*, 5, 1040.
- Senior, D.J., Mayers, P.R., Breuil, C., Saddler, J.N. (1990) The interaction of xylanase with pulps: non-selective adsorption and inactivation of xylanase. In: Kirk, T.K., Chang, H.-M. (Eds.), *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*. Butterworth–Heinemann, Boston, MA, pp. 169–182.
- Shafiei, M., Karimi, K. and Taherzadeh, M.J. (2010) Pretreatment of spruce and oak by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for efficient conversion of their cellulose to ethanol. *Bioresour. Technol.*, 101, 4914–4918.
- Shallom, D. and Shoham, Y. (2003) Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 219-228.
- Shill, K., Padmanabhan, S., Xin, Q., Prausnitz, J.M., Clark, D.S. and Blanch, H.W. (2011) Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: Enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 511–520.
- Signori, L., Passolunghi, S., Ruohonen, L., Porro, D. and Branduardi, P. (2014) Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. *Microb. Cell Fact.*, 13, 51.

- Silva, C. de O.G., Aquino, E.N., Ricart, C.A.O., Midorikawa, G.E.O., Miller, R.N.G. and Filho, E.X.F. (2015) GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Lett.*, 362, 1–9.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D. and Osborne, J. (2007) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour. Technol.*, 98, 3000–3011.
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N. and Taylor, M. (2010) An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.*, 101, 1570–1580.
- Singh, S., Simmons, B.A. and Vogel, K.P. (2009) Visualization of biomass solubilization and cellulose regeneration during ionic liquid pretreatment of switchgrass. *Biotechnol. Bioeng.*, 104, 68–75.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Pandey, A. and Ganansounou, E. (2017) Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresour. Technol.*, 245, 1352–1361.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C. and Pandey, A. (2013) Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour. Technol.*, 127, 500–507.
- Sitepu, I.R., Shi, S., Simmons, B.A., Singer, S.W., Boundy-Mills, K. and Simmons, C.W. (2014) Yeast tolerance to the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *FEMS Yeast Res.*, 14, 1286–1294.
- Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M. and Goto, M. (2016) Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. *Biotechnol. J.*, 11, 1000–1013.
- Sjöström, E. and Westermark, U. (1999) Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution. In Eero Sjöström and R. Alén, eds. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*. Springer Series in Wood Science. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–19.
- Skoog, K. and Hahn-Hägerdal, B. (1990) Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3389–3394.
- Slekar, K.H., Kosman, D.J. and Culotta, V.C. (1996) The Yeast Copper/Zinc Superoxide Dismutase and the Pentose Phosphate Pathway Play Overlapping Roles in Oxidative Stress Protection. *J. Biol. Chem.*, 271, 28831–28836.
- Slininger, P.J., Bolen, P.L. and Kurtzman, C.P. (1987) *Pachysolen tannophilus*: Properties and process considerations for ethanol production from d-xylose. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 5–15.
- Slininger, P.J., Shea-Andersh, M.A., Thompson, S.R., Dien, B.S., Kurtzman, C.P., Balan, V., da Costa Souza, L., Uppugundla, N., Dale, B.E. and Cotta, M.A. (2015) Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid- and base-pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. *Biotechnol. Biofuels*, 8, 60.
- Smiley, K. L. and Bolen, P. L. (1982) Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.*, 4, 607–610.
- Smolke, C. (2009) *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*, CRC Press.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M. and Zacchi, G. (2003) Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomass Bioenergy*, 24, 475–486.
- Solomon, B.D., Barnes, J.R. and Halvorsen, K.E. (2007) Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass Bioenergy*, 31, 416–425.
- Soudham, V.P., Raut, D.G., Anugwom, I., Brandberg, T., Larsson, C. and Mikkola, J.-P. (2015) Coupled enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation: ionic liquid pretreatment for enhanced yields. *Biotechnol. Biofuels*, 8.

Spyridon, A., Euverink, W. and Jan, G. (2016) Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electron. J. Biotechnol.*, 19, 44–53.

Sreenath, H.K., Chapman, T.W. and Jeffries, T.W. (1986) Ethanol production from d-xylose in batch fermentations with *Candida shehatae* : process variables. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 294–299.

Srilekha Yadav, K., Naseeruddin, S., Sai Prashanthi, G., Sateesh, L. and Venkateswar Rao, L. (2011) Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.*, 102, 6473–6478.

Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P.K., Gupta, V.K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A. and Ramteke, P.W. (2018) Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 82, 2379–2386.

Stambuk, B.U., Franden, M.A., Singh, A. and Zhang, M. (2003) D-Xylose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. In B. H. Davison, J. W. Lee, M. Finkelstein, and J. D. McMillan, eds. *Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Fourth Symposium*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 255–263.

Stambuk, B.U., da Silva, M.A., Panek, A.D. and de Araujo, P.S. (1999) Active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, 105–110.

Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P.J. and Stanley, G.A. (2010) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 109, 13–24.

Stolte, S., S. Abdulkarim, J. Arning, A.-K. Blomeyer-Nienstedt, U. Bottin-Weber, M. Matzke, J. Ranke, B. Jastorff and J. Thoming (2008). Primary biodegradation of ionic liquid cations, identification of degradation products of 1-methyl-3-octylimidazolium chloride and electrochemical wastewater treatment of poorly biodegradable compounds. *Green Chem.*, 10, 214–224.

Suarez, A.Z. P., Einloft, S., Dullius, E.L. J., de Souza, F. R. and Dupont, J. (1998) Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1-n-butyl-3-methylimidazolium cation. *J. Chim. Phys.*, 95, 1626–1639.

Sun, N., Rahman, M., Qin, Y., L. Maxim, M., Rodríguez, H. and D. Rogers, R. (2009) Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.*, 11, 646–655.

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

Sunna, A., Gibbs, M. D., Chin, C. W. J., Nelson, P. J. and Bergquist, P. L. (2000) A gene encoding a novel multidomain  $\beta$ -1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant rnzyme on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 664–670.

Sutcliffe, R. and Saddler, J.N. (1986) The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17, 749–762.

Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D. and Rogers, R.D. (2002) Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4974–4975.

**T**adesse, H. and Luque, R. (2011) Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. *Energy Environ. Sci.*, 4, 3913–3929.

Taherzadeh, J. M., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Lidén, G. (1997) Characterization and Fermentation of Dilute-Acid Hydrolyzates from Wood. *Int. Eng. Chem. Res.*, 36, 4659–4665.

Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. (2007) Acid-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2, 472–499.

- Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A. and Dahlman, O. (2002) Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono) xylan isolated from birch and beech. *Carbohydr. Res.*, 337, 373–377.
- Teresa Garcia, M., Gathergood, N. and J. Scammells, P. (2005) Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem.*, 7, 9–14.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P. and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta*, 216, 193–202.
- Timson, D.J. (2007) Galactose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 1, 63,73.
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1984) Alcoholic Fermentation of d-Xylose by Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1221–1223.
- Torget, R. and Teh-An, H. (1994) Two-temperature dilute-acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 45, 5–22.
- Turner B. M., Spear, K. S., Huddleston, G. J., Holbrey, D. J., and Rogers, D. R. (2003) Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.*, 5, 443–447.
- Tye, Y.Y., Lee, K.T., Wan Abdullah, W.N. and Leh, C.P. (2016) The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 60, 155–172.
- U**madevi Sajjan, S. and Salimath, P.V. (1986) Isolation of a neutral linear xylan from guar seed husk. *Carbohydr. Res.*, 145, 348–350.
- V**alenzuela, S.V., Diaz, P. and Pastor, F.I.J. (2014) Xyn11E from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23 : a LppX-chaperone-dependent xylanase with potential for upgrading paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 5949–5957.
- Vallet, C., Saïd, R., Rabiller, C. and Martin, M.L. (1996) Natural Abundance Isotopic Fractionation in the Fermentation Reaction: Influence of the Nature of the Yeast. *Bioorganic Chem.*, 24, 319–330.
- Van den Brink, J., Akeroyd, M., van der Hoeven, R., Pronk, T. J., de Winde, H. J. and Daran-Lapujade, P. (2009) Energetic limits to metabolic flexibility : responses of *Saccharomyces cerevisiae* to glucose–galactose transitions. *Microbiology*, 155, 1340–1350.
- Van den Broek, P.J.A., van Gompel, A.E., Luttkik, M.A.H., Pronk, J.T. and van Leeuwen, C.C.M. (1997) Mechanism of glucose and maltose transport in plasma-membrane vesicles from the yeast *Candida utilis*. *Biochem. J.*, 321, 487–495.
- Van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 32, 199–224.
- Van Dyk, J.S. and Pletschke, B.I. (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.*, 30, 1458–1480.
- Van Maris, A.J.A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttkik, M.A.H., Wouter Wisselink, H., Alexander Scheffers, W., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T. (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90, 391–418.
- Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2007) Biocatalysis in Ionic Liquids. *Chem. Rev.*, 107, 2757–2785.
- Van Rooyen, R., Hahn-Hägerdal, B., La Grange, D.C. and van Zyl, W.H. (2005) Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Biotechnol.*, 120, 284–295.

Van Soest, P.J. (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 46, 829–835.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991) Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74, 3583–3597.

Vasheghani Farahani, S., Kim, Y.-W. and Schall, C.A. (2016) A coupled low temperature oxidative and ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass. *Catal. Today*, 269, 2–8.

Verduyn, C., Van Kleef, R., Frank Jzn, J., Schreuder, H., Van Dijken, J. P. and Scheffers, W. A. (1985) Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.*, 226, 669–677.

Vidotto, V., Picerno, G., Caramello, S. and Paniate, G. (1988) Importance of some factors on the dimorphism of *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 104, 129–135.

Visser, A.E., Swatloski, R.P., Reichert, W.M., Griffin, S.T. and Rogers, R.D. (2000) Traditional Extractants in Nontraditional Solvents: Groups 1 and 2 Extraction by Crown Ethers in Room-Temperature Ionic Liquids. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39, 3596–3604.

Vorwerk, S., Somerville, S. and Somerville, C. (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.*, 9, 203–209.

Vu, V.V., Beeson, W.T., Span, E.A., Farquhar, E.R. and Marletta, M.A. (2014) A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 13822–13827.

**W**ada, M., Ike, M. and Tokuyasu, K. (2010) Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. *Polym. Degrad. Stab.*, 95, 543–548.

Wagner, T.A. and Kohorn, B.D. (2001) Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion. *Plant Cell*, 13, 303–318.

Wahlström, M. R. and Suurnäkki, A. (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polysaccharides in the presence of ionic liquids. *Green Chem.*, 17, 694–714.

Walker, G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester, England.

Walker, G.M. and White, N.A. (2017) Introduction to Fungal Physiology. In K. Kavanagh, ed. *Fungi*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–35.

Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A. and Yang, B. (2019) From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresour. Technol.*, 271, 449–461.

Wang, H., Tucker, M. and Ji, Y. (2013) Recent Development in Chemical Depolymerization of Lignin: A Review. *J. Appl. Chem.*, 2, 2280–2287.

Wasewar, K.L., Yawalkar, A.A., Moulijn, J.A. and Pangarkar, V.G. (2004) Fermentation of Glucose to Lactic Acid Coupled with Reactive Extraction: A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 43, 5969–5982.

Weerachanchai, P. and J-M. Lee (2014). Recyclability of an ionic liquid for biomass pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 169, 336–343.

Weusthuis, R.A., Visser, W., Pronk, J.T., Scheffers, W.A. and van Dijken, J.P. (1994) Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology*, 140, 703–715.

White, M. E. (2010) *Woody Biomass for Bioenergy and Biofuels in the United States: A Briefing Paper*, DIANE Publishing, United State Department of Agriculture, General Technical Report PNW-GTR-825.

Wilkes, J.S. and Zaworotko, M.J. (1992) Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 965–967.

Wilkes, J.S., Levisky, J.A., Wilson, R.A. and Hussey, C.L. (1982) Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorg. Chem.*, 21, 1263–1264.

Williamson, P.R., Huber, M.A. and Bennett, J.E. (1993) Role of maltase in the utilization of sucrose by *Candida albicans*. *Biochem. J.*, 291, 765–771.

Wingren, A., Galbe, M. and Zacchi, G. (2003) Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnol. Prog.*, 19, 1109–1117.

Witteveen, C.F.B., Busink, R., Van De Vondervoort, P., Dijkema, C., Swart, K. and Visser, J. (1989) L-Arabinose and d-Xylose Catabolism in *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 135, 2163–2171.

Wong, K.K.Y., Deverell, K.F., Mackie, K.L., Clark, T.A. and Donaldson, L.A. (1988) The relationship between fiber-porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 447–456.

Wood, T. (1986) Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Funct.*, 4, 241–247.

Wu, K., Feng, G., Liu, Y., Liu, C., Zhang, X., Liu, S., Liang, B. and Lu, H. (2018) Enhanced hydrolysis of mechanically pretreated cellulose in water/CO<sub>2</sub> system. *Bioresour. Technol.*, 261, 28–35.

Wu, Z. and Lee, Y.Y. (1997) Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnol. Lett.*, 19, 977–979.

Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapfle, M., Ladisch, M.R. and Lee, Y.Y. (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.*, 96, 1959–1966.

Xia, S., Baker, G.A., Li, H., Ravula, S. and Zhao, H. (2014) Aqueous ionic liquids and deep eutectic solvents for cellulosic biomass pretreatment and saccharification. *RSC Adv.*, 4, 10586–10596.

Xiang, Q., Lee, Y.Y., Pettersson, P.O. and Torget, R.W. (2003) Heterogeneous Aspects of Acid Hydrolysis of  $\alpha$ -Cellulose. In B. H. Davison, J. W. Lee, M. Finkelstein, and J. D. McMillan, eds. *Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Fourth Symposium*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 505–514.

Xu, H., Pan, W., Wang, R., Zhang, D. and Liu, C. (2012) Understanding the mechanism of cellulose dissolution in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid via quantum chemistry calculations and molecular dynamics simulations. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 26, 329–337.

Yang, Z. and Pan, W. (2005) Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 19–28.

Yasuda, M., Nagai, H., Takeo, K., Ishii, Y. and Ohta, K. (2014) Bio-ethanol production through simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). *SpringerPlus*, 3, 333.

Yoon, S.-H., Mukerjea, R. and Robyt, J.F. (2003) Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydr. Res.*, 338, 1127–1132.

You, K.M., Rosenfield, C.-L. and Knipple, D.C. (2003) Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1499–1503.

Yu, X., Bao, X., Zhou, C., Zhang, L., Yagoub, A.E.-G.A., Yang, H. and Ma, H. (2018) Ultrasound-ionic liquid enhanced enzymatic and acid hydrolysis of biomass cellulose. *Ultrason. Sonochem.*, 41, 410–418.

Yu, Z. and Zhang, H. (2004) Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.*, 93, 199–204.

Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N. and Faruq, G. (2016) Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass : An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 66, 751–774.

Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N. and Faruq, G. (2017) Bioethanol production from renewable sources : Current perspectives and technological progress. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 71, 475–501.

Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerius, A.L. and Weckhuysen, B.M. (2010) The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chem. Rev.*, 110, 3552–3599.

Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J. and Spiess, A.C. (2009) High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. *Bioresour. Technol.*, 100, 2580–2587.

Zhang, H., Wu, J., Zhang, J. and He, J. (2005) 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride Room Temperature Ionic Liquid: A New and Powerful Nonderivatizing Solvent for Cellulose. *Macromolecules*, 38, 8272–8277.

Zhang, J., Moilanen, U., Tang, M. and Viikari, L. (2013) The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. *Biotechnol. Biofuels*, 6, 18.

Zhang, J., Zhang, H., Wu, J., Zhang, Jun, He, J. and Xiang, J. (2010) NMR spectroscopic studies of cellobiose solvation in EmimAc aimed to understand the dissolution mechanism of cellulose in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 1941–1947.

Zhang, Q., Yan, X., Zhang, L. and Tang, W. (2006) Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a  $\beta$ -mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. *Mol. Biol.*, 40, 368–374.

Zhang, S., Qi, X., Ma, X., Lu, L., Zhang, Q. and Deng, Y. (2012) Investigation of cation–anion interaction in 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium-based ion pairs by density functional theory calculations and experiments. *J. Phys. Org. Chem.*, 25, 248–257.

Zhang, Y.-H.P. and Lynd, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 797–824.

Zhao, H., A. Baker, G., Song, Z., Olubajo, O., Crittle, T. and Peters, D. (2008) Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem.*, 10, 696–705.

Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O. and Person, V.N. (2009) Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.*, 139, 47–54.

Zhao, X., Zhang, L. and Liu, D. (2012) Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Biorefining*, 6, 465–482.

Zheng, Y., Pan, Z. and Zhang, R. (2009) Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, 2, 51–68.

Zhu, J., Luo, X., Tian, S., Gleisner, R., Negron, J. and Horn, E. (2011) Efficient ethanol production from beetle-killed lodgepole pine using SPORL technology and *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification. *Tappi J.*, 10, 9–18.

Zhu, J.Y. and Pan, X.J. (2010) Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresour. Technol.*, 101, 4992–5002.

Zhu, J.Y., Pan, X. and Zalesny, R.S. (2010) Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 847–857.

Zhu, S. (2008) Use of ionic liquids for the efficient utilization of lignocellulosic materials. J. Chem. Technol. Biotechnol., 83, 777–779.

Zhu, S., Y. Wu, Q. Chen, Z. Yu, C. Wang, S. Jin, Y. Ding and G. Wu (2006). Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. Green Chem., 8 : 325-327.

Zuin, V.G. (2016) Circularity in green chemical products, processes and services: Innovative routes based on integrated eco-design and solution systems. Curr. Opin. Green Sustain. Chem., 2, 40–44.

# *Annexes*

## Publications

### 1. Parue

- ❖ Mehmood N., Alayoubi R., Husson E., Jacquard C., Buchs J., Sarazin C. and Gosselin I. (2018) *Kluyveromyces marxianus*, an attractive yeast for ethanolic fermentation in presence of imidazolium ionic liquids. Int. J. Mol. Sci., 19, 887. doi:10.3390/ijms19030887

### 2. En cours d'évaluation

- ❖ Alayoubi R., Mehmood N., Husson E., Kouzayha A., Tabcheh M., Chaveriat, L., Sarazin C. and Gosselin I. Ionic liquid pretreatment at low temperature of lignocellulosic biomass enhances bioethanol yields. Soumise à Renewable Energy le 29/11/2018, en révision depuis 13/06/2019.
- ❖ Huet G., Hadad C., Husson E., Laclef S., Lambertyn V., Araya-Farias M., Jamali A., Courty M., Alayoubi R., Gosselin I., Sarazin C. and Nguyen Van Nhien A. Straightforward Extraction and Selective Bioconversion of High Purity Chitin from Bombyx eri Larva: Toward an Integrated Insect Biorefinery. Soumise à Carbohydrate Polymers le 06/03/2019, en révision depuis 27/05/2019.



Article

# *Kluyveromyces marxianus*, an Attractive Yeast for Ethanolic Fermentation in the Presence of Imidazolium Ionic Liquids

Nasir Mehmood <sup>1</sup>, Ranim Alayoubi <sup>1,2</sup>, Eric Husson <sup>1</sup>, Cédric Jacquard <sup>3</sup>, Jochen Büchs <sup>4</sup>, Catherine Sarazin <sup>1</sup> and Isabelle Gosselin <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Unité Génie Enzymatique et Cellulaire UMR-CNRS 7025, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint-Leu, 80039 Amiens CEDEX, France; nasir.mehmood@u-picardie.fr (N.M.); ranim.alayoubi@u-picardie.fr (R.A.); eric.husson@u-picardie.fr (E.H.); catherine.sarazin@u-picardie.fr (C.S.)
- <sup>2</sup> Biotechnologies Appliquées LBA3B, Centre AZM, EDST, Université Libanaise, 1300 Tripoli, Lebanon
- <sup>3</sup> Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne UPRES-EA 4707, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP1039, 51687 Reims CEDEX 2, France; cedric.jacquard@univ-reims.fr
- <sup>4</sup> AVT—Biochemical Engineering, RWTH Aachen University, Forckenbeckstraße 51, 52074 Aachen, Germany; jochen.buechs@avt.rwth-aachen.de
- \* Correspondence: isabelle.gosselin@u-picardie.fr; Tel.: +33-3-22-82-74-73

Received: 30 January 2018; Accepted: 14 March 2018; Published: 16 March 2018

**Abstract:** Imidazolium ionic liquids (ILs) are promising solvents for lignocellulosic biomass (LCB) pretreatment and allow the achievement of higher ethanolic yields after enzymatic hydrolysis and ethanolic fermentation. However, residual ILs entrapped in pretreated biomass are often toxic for fermentative microorganisms, but interaction mechanisms between ILs and cells are still unknown. Here we studied the effects of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [Emim][OAc] and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] on *Kluyveromyces marxianus*, a thermotolerant ethanologenic yeast. Morphological impacts induced by ILs on *K. marxianus* were characterized by Scanning Electron Microscopy analysis and showed wrinkled, softened, and holed shapes. In Yeast-Malt-Dextrose (YMD) medium, *K. marxianus* tolerated IL additions up to 2% for [Emim][OAc] and 6% for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Below these thresholds, some IL concentrations enhanced ethanolic yields up to +34% by switching the metabolic status from respiratory to fermentative. Finally, *K. marxianus* fermentation was applied on several substrates pretreated with [Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] and enzymatically hydrolyzed: a model long fiber cellulose and two industrial LCBs, softwood (spruce) and hardwood (oak) sawdusts. The maximum ethanolic yields obtained were 1.8 to 3.9 times higher when substrates were pretreated with imidazolium ILs. Therefore *K. marxianus* is an interesting fermentative yeast in a second-generation bioethanol process implying IL pretreatment.

**Keywords:** *Kluyveromyces marxianus*; lignocellulosic biomass; ionic liquids; second-generation bioethanol; respirofermentative metabolism; scanning electron microscopy

## 1. Introduction

Lignocellulosic biomass (LCB) is a promising sustainable raw material for second-generation bioethanol production. Whatever the feedstocks (agricultural or forest residues, dedicated crops), a first step to disorganize the LCB architecture, named pretreatment, is a prerequisite to make cellulose more accessible to cellulolytic enzymes and generate fermentable sugars [1–3]. Ionic liquids (ILs) are among the most efficient pretreatments to increase cellulose enzymatic digestibility while allowing a better recovery of lignin and hemicellulose for subsequent valorization in a biorefinery strategy [4–6]. However, detrimental effects could be observed due to residual IL entrapped in the pretreated LCB

despite extensive washings (from 0.1 to 10% depending on the LCB and the IL) leading to toxic effects on fermentative microorganisms, but without an established mechanism [6–8]. Moreover, a lot of contradictory works could be found in the literature explaining the deleterious effect of the anionic IL moiety, or of the cationic part, or both, or none [4,7–11].

Among ILs, two hydrophilic imidazolium-derived ILs emerged for their efficient compromise between LCB deconstruction and enzyme deactivation: the classically used 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [Emim][OAc] and the newly developed 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] [7,8,11–13]. In the present work, the impact of low concentrations of these two imidazolium-ILs was studied for the first time on *Kluyveromyces marxianus*, a yeast species standing out in second-generation bioethanol processes because of its extreme thermotolerance, attractive for simultaneous saccharification and fermentation [14–16]. We show that *K. marxianus* can tolerate higher IL concentrations than the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* without previous adaptation to IL [17]. Then *K. marxianus* was utilized in a separate hydrolysis and fermentation (SHF) process on LCBs: the model long fiber cellulose and two industrial woody LCBs, spruce sawdust (softwood) and oak sawdust (hardwood). Significantly higher ethanolic yields were obtained for all LCBs after a pretreatment with [Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] and an enzymatic hydrolysis. Thus, *K. marxianus* is a suitable candidate for ethanolic fermentation in low residual imidazolium IL concentrations.

## 2. Results

The *K. marxianus* UMIP 2234.94 strain used in this study had an optimal growth temperature of 35 °C which was also the temperature for optimal ethanol formation. This relatively low temperature for a species described to be thermotolerant has already been reported by Fonseca et al. [15]. All the experiments were further realized at 35 °C.

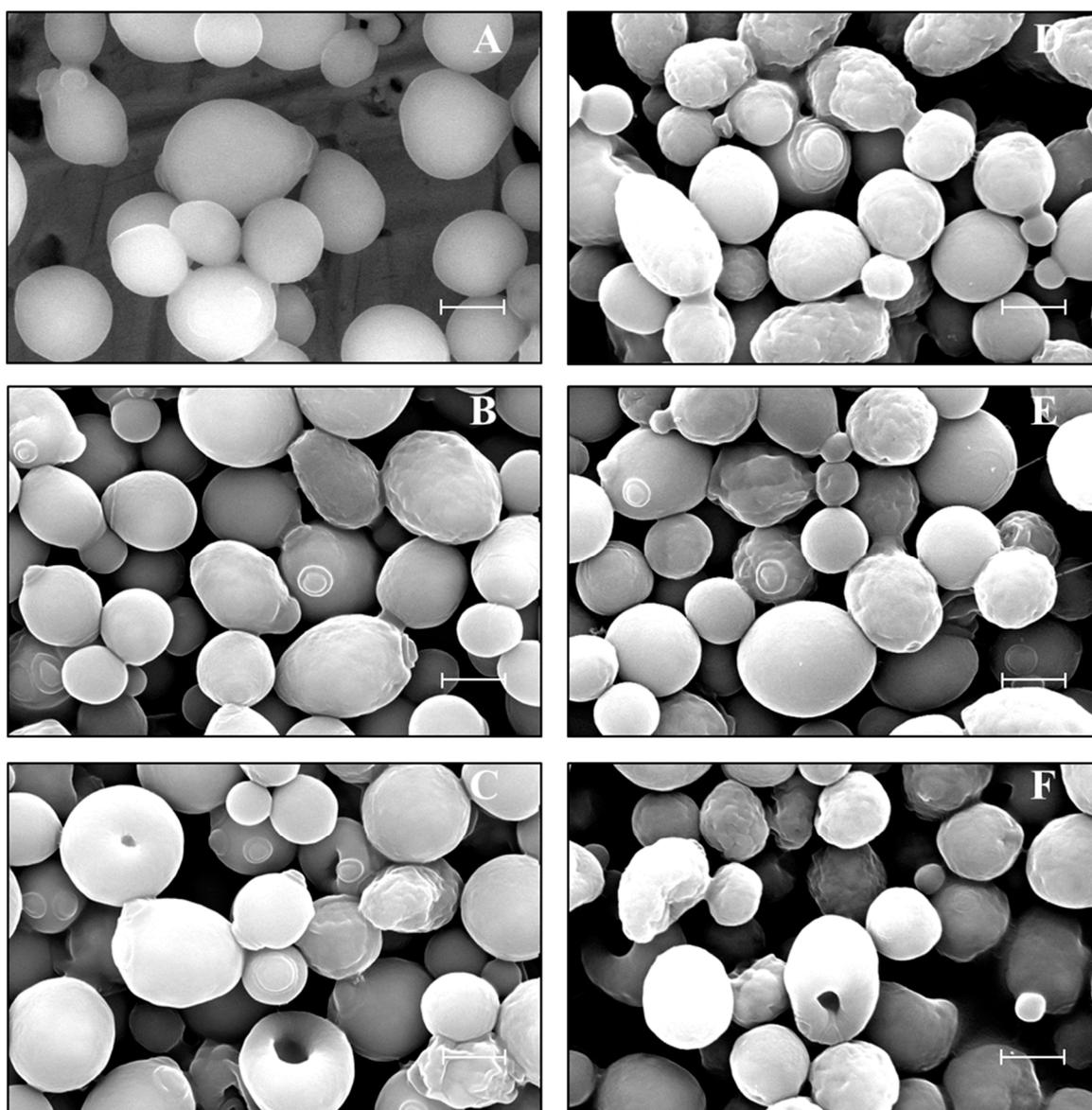
### 2.1. Yeast Morphology in Ionic Liquid (IL)

The addition of low concentrations of [Emim][OAc] and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] was firstly assessed on *K. marxianus* morphology by scanning electron microscopy (SEM) analyses. In Yeast-Malt-Dextrose (YMD) standard medium without IL (Figure 1A), the yeasts were oval and well swollen. Some of them were budding and the scars of previous buds were visible. When 0.5% [Emim][OAc] (*v/v*) was added (Figure 1B), some yeast surfaces became wrinkled and cell walls appeared to soften. With 1% [Emim][OAc] (Figure 1C), the wrinkled aspect was more visible and holes in cells appeared. The supplementation of 0.5% and 1% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] led to the appearance of wrinkled and softened yeasts (Figure 1D,E), and holed shapes occurred with 2% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Figure 1F).

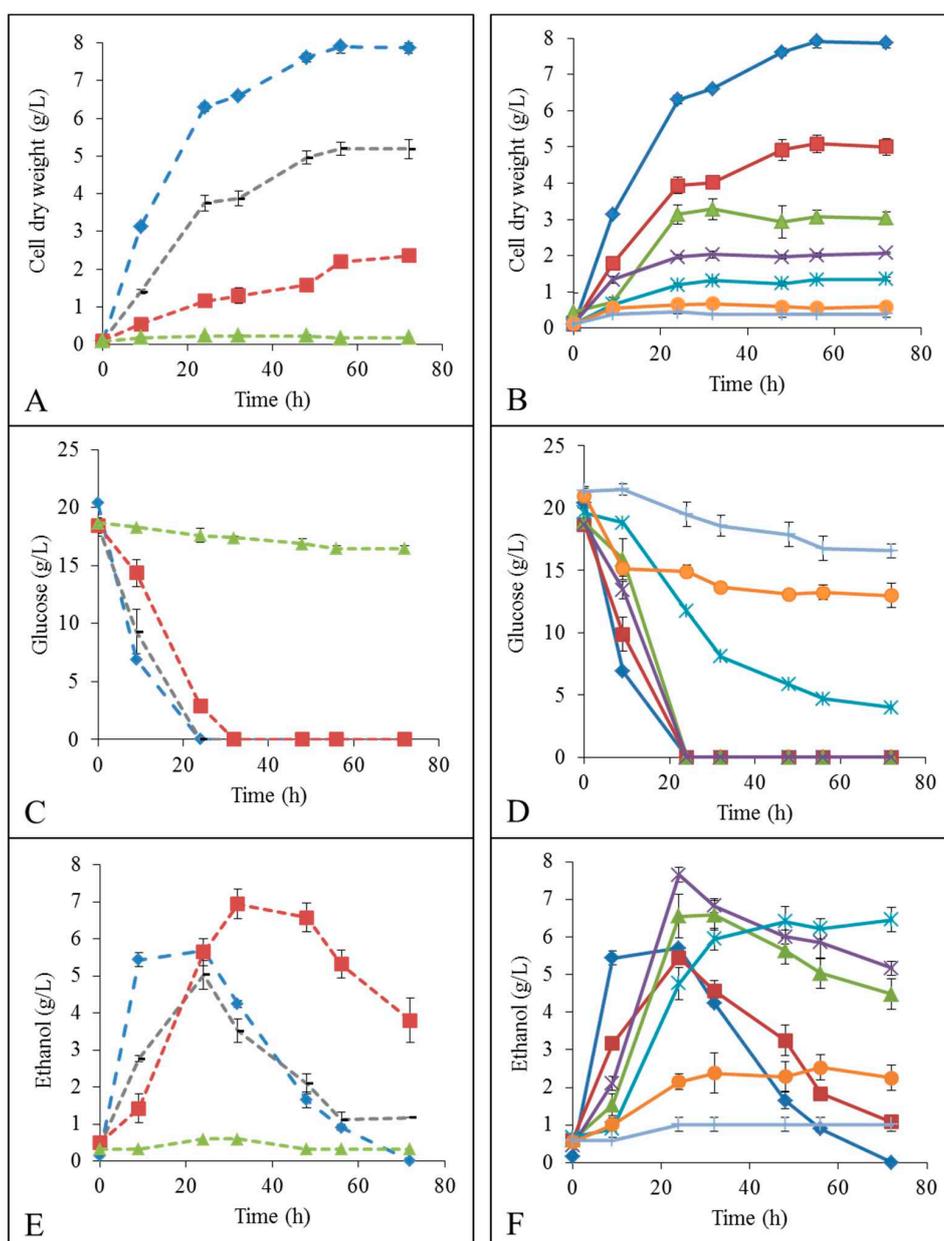
### 2.2. Growth, Glucose Consumption and Ethanol Formation in IL

The impact of low IL concentrations was followed on *K. marxianus* growth in YMD medium, expressed as cell dry weight (CDW), by glucose consumption and ethanol formation (Figure 2). Both ILs showed inhibitory effects on yeast growth and reduced the maximal CDW proportionally to the IL concentration. [Emim][OAc] was more deleterious for *K. marxianus* than [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] as no more growth was observed with addition of 2% [Emim][OAc], while 6% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Figure 2A,B). This points the importance of the anionic moiety in the interactions between ILs and yeast cells. The glucose consumption was inversely proportional to yeast growth and was almost null for the respective concentrations cited above (Figure 2C,D). The maximum ethanol formation without IL was 5.7 g/L at 24 h corresponding to the time when glucose is completely exhausted (Figure 2E,F). Then ethanol decreased progressively until reaching 0 g/L at 72 h. With the addition of 0.5% [Emim][OAc], the maximum ethanol slightly decreased to 5.0 g/L at 24 h, but with the addition of 1% [Emim][OAc], the maximal ethanol became higher than the condition without IL (6.9 g/L, i.e., +22%). However, a small supplementary increase in IL concentration to 2% cancelled growth and ethanol production (Figure 2A,E). When 1% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] was added, *K. marxianus* produced

similar maximum ethanol concentration (5.5 g/L at 24 h) than standard condition without IL (5.7 g/L) (Figure 2F). However, when 2%, 3% or 4% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] were added, the maximum ethanol formation became significantly higher (from +13% to +34%) than without IL: 6.6, 7.7 or 6.5 g/L, respectively. Moreover, ethanol did not decrease to zero after glucose exhaustion which could be a supplementary advantage in the context of bioethanol production. However, a small another increase in [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] concentration reduced ethanol formation to 2.5 g/L with 5% IL and 1.0 g/L with 6% IL (Figure 2F).



**Figure 1.** Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of *K. marxianus* cells grown in: (A) Yeast-Malt-Dextrose (YMD); (B) YMD + 0.5% [Emim][OAc]; (C) YMD + 1% [Emim][OAc]; (D) YMD + 0.5% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]; (E) YMD + 1% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]; (F) YMD + 2% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Bar = 2 μm.



**Figure 2.** Evolution of cell dry weight in g/L (A,B), glucose concentration in g/L (C,D) and ethanol concentration in g/L (D,E) by *K. marxianus* grown in: —◆— YMD; — YMD + 0.5% ionic liquid (IL); —■— YMD + 1% IL; —▲— YMD + 2% IL; —×— YMD + 3% IL; —\*— YMD + 4% IL; —●— YMD + 5% IL and —+— YMD + 6% IL (means  $\pm$  S.D.). Dashed lines for [Emim][OAc] (A,C,E) and full lines for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (B,D,F).

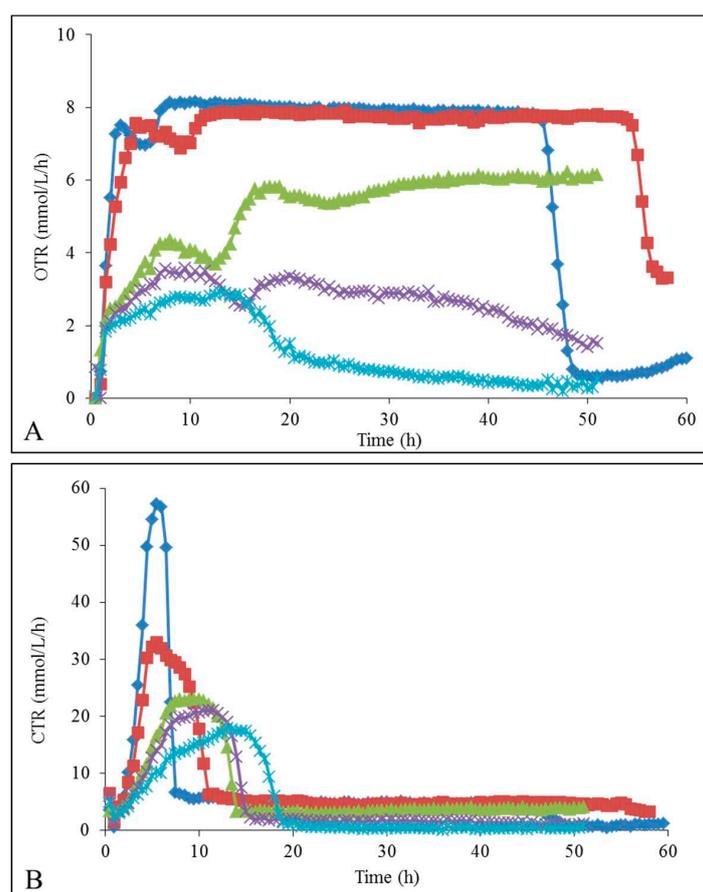
### 2.3. Oxygen Transfer Rate (OTR) and Carbon Dioxide Transfer Rate (CTR) Profiles

Then, the *K. marxianus* respirofermentative activity was studied in presence of [Emim][OAc] (Figure S1) and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Figure 3). For the control condition without IL, the oxygen transfer rate (OTR) (Figure 3A) rapidly increased to a value of 7.5 mmol/L/h at 3 h, followed by a small wave at 7.0 mmol/L/h between 3 and 8 h. At the same time, the carbon dioxide transfer rate (CTR) increased to 57 mmol/L/h indicating a high release of CO<sub>2</sub> coupled to biomass production and respiration metabolism. This important CO<sub>2</sub> liberation limited in time is responsible for the downwards wave observed in OTR values. Then the OTR remained constant at 8 mmol/L/h up to 47 h, indicating

a maximum oxygen transfer capacity and a clear O<sub>2</sub> limitation [18,19]. In parallel, the CTR was constant at about 5.5 mmol/L/h, which reflected the consumption of ethanol by yeasts after depletion of glucose in accordance with the previous observations in Figure 2F. Then, at 45 h, the OTR dropped sharply to a value of 0.5 mmol/L/h, as well as the CTR to zero at the same time, which proved that all ethanol was consumed by *K. marxianus*, no more carbon substrate was available anymore.

When adding [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], the maximum OTR decreased progressively and O<sub>2</sub> was no longer limiting from 2% IL. Concomitantly, the maximum CTR slowed down when [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] concentration rose. Altogether, these results indicated that the yeast metabolism switched to fermentative with lower O<sub>2</sub> consumption and decreased CO<sub>2</sub> liberation [17,18], which was consistent with ethanol formations higher with 2–4% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Figure 2F). In addition, the CTR dropped directly to zero after glucose depletion, without the plateau to about 5 mmol/L/h. These results confirmed that ethanol was more weakly consumed by yeasts (or not at all depending on the [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] concentrations) and remained approximately constant until the end of the culture (Figure 2F).

The results obtained with *K. marxianus* in the presence of [Emim][OAc] (Figure S1) were similar to those with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], except that the [Emim][OAc] concentrations tolerated by the yeasts were lower, as seen in growth results (Figure 2A,C,E). From 1% [Emim][OAc], the OTR and CTR values were low indicating a change from an aerobic to an anaerobic metabolism, explaining the higher ethanolic yields observed in Figure 2E.



**Figure 3.** Oxygen Transfer Rate OTR (A) and Carbon dioxide Transfer Rate CTR (B) in mmol/L/h of *K. marxianus* grown in: —◆— YMD; —■— YMD + 1% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]; —▲— YMD + 2% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]; —×— YMD + 3% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]; —\*— YMD + 4% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]; —○— YMD + 5% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] and —+— YMD + 6% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. Error bars are not represented to avoid overloading the figure.

#### 2.4. Application to Lignocellulosic Biomasses (LCBs)

These first results obtained with ILs in a medium containing glucose as the sole carbon source were transposed to various LCBs: the model long fiber cellulose and two industrial wood residues, spruce sawdust (softwood) and oak sawdust (hardwood). These LCBs were all pretreated with [Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] following a protocol already described [13,20,21], except that the pretreatment temperature was 45 °C. The IL-pretreated LCBs were recovered and intensively washed with ultra-pure water, but residual ILs estimated to about 10% (*w/w*) remained entrapped in the pretreated matrix [13,20,21].

The composition of the two industrial sawdusts before and after pretreatment with [Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (Table 1) showed that the cellulose content was higher for spruce (55.4%) than oak (44.7%) sawdusts, whereas it was the opposite for the xylose content (4.2% for spruce and 14.8% for oak) representing the hemicellulose moiety of the LCBs. The other components, lignin, arabinose, and extractives, were similar for both sawdusts. After spruce pretreatment with both ILs, substrate recovery was around 85% indicating the deconstruction and the fractioning of the LCBs which could be noticed by the selective decrease of the lignin content, –15% for [Emim][OAc] and –20% for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] and a small extractive loss. The other constituents of spruce sawdust were not affected by the IL pretreatment, except a light increase in cellulose content (5%) with the [Emim][OAc]. The wood specie influenced the impact of IL pretreatment as the oak sawdust gave similar results as spruce after a pretreatment with [Emim][OAc] only: 85.3% substrate recovery linked to lignin and extractive losses (–12% and –45%, respectively). Beside a 4% cellulose increase, the xylose content raised from 14.8 to 18.5% (+25%). When [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] was used for oak pretreatment, the substrate recovery was higher than previously seen (89.2%) and no modification in none component was detected. The [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] IL seemed to less deconstruct and fractionate the oak hardwood.

**Table 1.** Composition of spruce and oak sawdusts before and after pretreatment with [Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] <sup>a</sup>.

Samples	Pretreatment	Residue Recovery (% <i>w/w</i> )	Cellulose	Lignin	Xylose	Arabinose	Extractives
Spruce sawdust	None	100	55.4 ± 1.3	28.7 ± 1.0	4.2 ± 0.4	1.4 ± 0.2	3.3 ± 1.0
	[Emim][OAc]	85.8 ± 1.2	58.2 ± 0.4	24.6 ± 0.5	3.7 ± 0.8	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.3
	[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	85.1 ± 2.3	56.6 ± 1.6	23.2 ± 1.4	3.5 ± 1.0	1.1 ± 0.2	2.6 ± 0.8
Oak sawdust	None	100	44.7 ± 0.3	26.7 ± 0.8	14.8 ± 1.3	1.2 ± 0.1	4.6 ± 1.1
	[Emim][OAc]	85.3 ± 0.8	46.5 ± 0.7	23.5 ± 1.8	18.5 ± 1.3	1.1 ± 0.1	2.5 ± 0.7
	[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	89.2 ± 1.1	46.3 ± 1.6	25.8 ± 1.6	16.3 ± 1.1	1.1 ± 0.1	3.8 ± 0.8

<sup>a</sup>: Compositions are expressed as percentage of the residues.

Then the IL-pretreated LCBs were enzymatically hydrolyzed with cellulases from *Trichoderma reesei* during 80 h. The enzymatic hydrolysis liberated various glucose yields depending on the pretreatment (Table 2).

**Table 2.** Glucose yields (%) obtained by enzymatic hydrolysis of long fiber cellulose, spruce sawdust, and oak sawdust non-pretreated, pretreated with [Emim][OAc] or pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].

Pretreatment	None	[Emim][OAc]	[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]
Long fiber cellulose	24.9 ± 0.5	68.2 ± 1.6	73.5 ± 1.7
Spruce sawdust	25.5 ± 1.7	49.3 ± 0.8	54.3 ± 3.5
Oak sawdust	11.6 ± 0.7	59.3 ± 2.9	32.1 ± 3.0

The glucose yields obtained from the long fiber cellulose were significantly increased by IL-pretreatment: 24.9% for the non-pretreated cellulose, 68.2% for the [Emim][OAc]-pretreated

cellulose and 73.5% for the [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]-pretreated cellulose respectively, indicating that IL-pretreatment allowed a better enzymatic digestibility of cellulose. The composition and the nature of wood species were different: 55.4% cellulose in spruce sawdust which is a softwood and 44.7% cellulose in the hardwood oak sawdust [13,21,22] and these discrepancies impacted glucose yields. For the spruce sawdust, 25.5% of glucose were liberated by enzymatic hydrolysis without previous pretreatment, and both IL pretreatments led to similar glucose yields, 49.3% for [Emim][OAc] and 54.3% for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. For untreated oak sawdust, glucose yield was lower (11.6%) due to inferior wood cellulose content. The pretreatment impact on oak was different depending on the IL and [Emim][OAc] pretreatment gave better glucose yield (59.3%) than [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (32.1%), which was consistent with the previous results on the composition of oak sawdust after [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] pretreatment (Table 1). However, in both cases it remained superior to the non-pretreated oak sawdust indicating that IL-pretreatment allowed a better cellulase accessibility to the cellulose fibers.

After LCB enzymatic hydrolysis, the liberated glucose units were fermented by *K. marxianus* in presence of the residual ILs still remaining in the reaction medium since the pretreatment step. A concentrated Yeast-Malt (YM) medium was added to the hydrolysis buffer to obtain good final YM component concentrations. The only ethanologenic substrate was the LCB enzymatic hydrolysate [17]. Results of yeast growth, glucose consumption and ethanol production are presented in Figure 4 for model cellulose, in Figure 5 for spruce sawdust and in Figure 6 for oak sawdust, respectively. Yeast growth expressed as CDW occurred in all the tested cases for all the LCBs (Figures 4A, 5A and 6A), but showed contradictory profiles compared to what was observed on YMD medium containing glucose as the only carbon source. For the hydrolyzed cellulose, growths were similar for untreated and [Emim][OAc]-pretreated substrates (3.9 and 4.4 g CDW/L, respectively) and lower for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]-pretreated cellulose (2.5 g CDW/L). The yeast growths on hydrolyzed oak sawdust had the same appearance with 2.1 g/L for untreated, 2.0 g/L for [Emim][OAc]-pretreated and 0.7 g/L for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]-pretreated oak. However, on spruce hydrolysates, the maximal CDW was lower for untreated condition (2.6 g/L) and both ILs generated identical growths: 3.1 for [Emim][OAc] and 3.2 for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]. The glucose units liberated by enzymatic hydrolysis were totally consumed by *K. marxianus* in all the experimental conditions in less than 24 h (Figures 4B, 5B and 6B) from initial concentrations linked to the glucose yields seen in Table 1. In the same manner, *K. marxianus* produced ethanol proportionally to the glucose yields (Figures 4C, 5C and 6C), i.e., the lowest ethanol concentration was obtained for oak sawdust pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (0.6 g/L) and the highest was for cellulose pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] (7.5 g/L). The maximum ethanol concentration occurred when glucose was completely exhausted by the yeasts around 8 h, and then ethanol started to decrease as it was consumed by the cells.

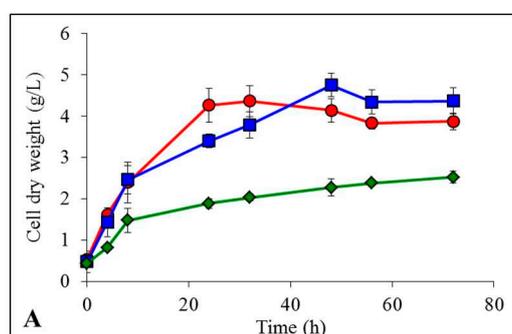
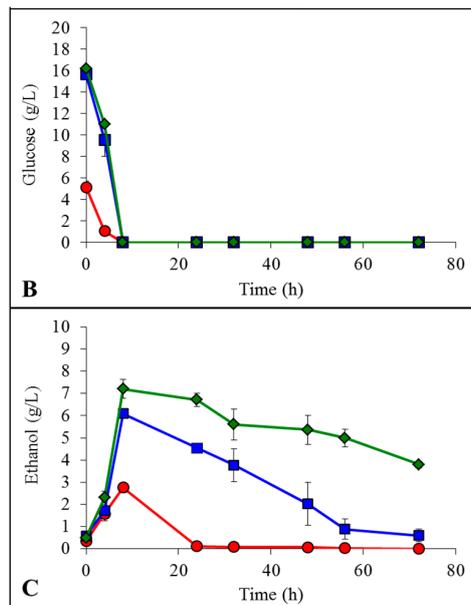
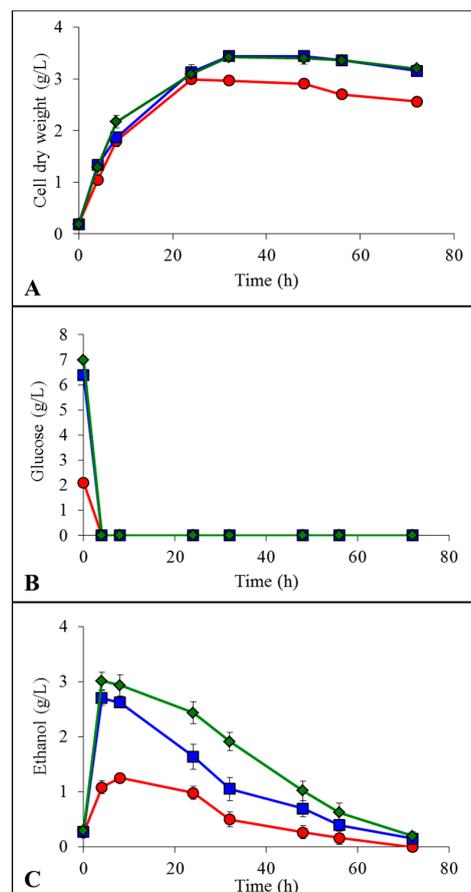


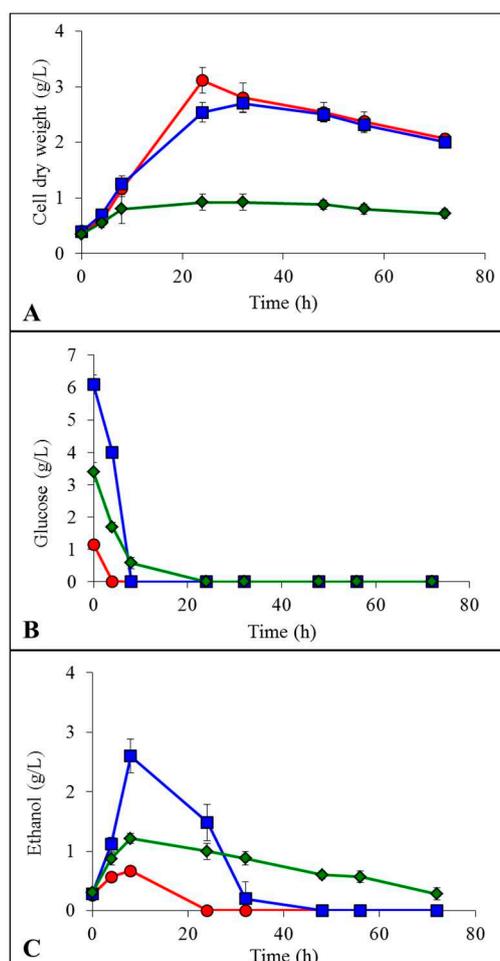
Figure 4. Cont.



**Figure 4.** Evolution of cell dry weight (A), glucose concentration (B) and ethanol concentration (C) by *K. marxianus* grown in Yeast-Malt (YM) + enzymatic hydrolysate of cellulose: ● non-pretreated, ■ pretreated with [Emim][OAc] and ◆ pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].



**Figure 5.** Evolution of cell dry weight (A), glucose concentration (B) and ethanol concentration (C) by *K. marxianus* grown in YM + enzymatic hydrolysate of spruce sawdust: ● non-pretreated, ■ pretreated with [Emim][OAc] and ◆ pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].



**Figure 6.** Evolution of cell dry weight (A), glucose concentration (B) and ethanol concentration (C) by *K. marxianus* grown in YM + enzymatic hydrolysate of oak sawdust: ● non-pretreated, ■ pretreated with [Emim][OAc] and ◆ pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>].

### 3. Discussion

Although ILs are now recognized as very promising solvents for efficient LCB pretreatments, their negative impacts on hydrolytic enzymes and fermentative cells remain a major drawback in their extensive use [4–6]. Nowadays, recent developments deal with genetically engineered yeast strains able to ferment both pentoses and hexoses, or consolidated bioprocessing with cellulase-displaying strains able to hydrolyze and ferment simultaneously the cellulosic part of LCBs [23–25]. More, performance optimizations of microorganisms tolerant to ILs naturally or genetically induced is gaining increasing interest [26–30]. However, very few works are exploring impact of ILs on fermenting microorganism physiology in a fundamental way and it remains very difficult to understand the mechanisms of IL toxicity on cells.

Here, we studied *K. marxianus* fermentation in diluted [Emim][OAc] and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] ILs in YMD medium (glucose as the sole carbon source) and in enzymatically hydrolyzed LCBs (cellulose, spruce sawdust, and oak sawdust). We showed for the first time SEM micrographs of *K. marxianus* cells in presence of low IL concentrations, which exhibited wrinkled, softened, and holed cell surfaces. Thus, both imidazolium ILs interacted with the yeast cell walls, composed essentially of polysaccharides [31], and disorganized the cell wall network probably in the same manner as ILs deconstruct the LCB architecture by disrupting the hydrogen bondings [4,31]. *K. marxianus* better tolerated [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] than [Emim][OAc], arguing in favor of a toxicity linked to the

anionic IL moiety, but maybe not exclusively. The importance of the anionic part is probably due to a stronger solvation ability of [Emim][OAc] compared to [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] in agreement with their respective  $\beta$  and  $\alpha$  Kamlet-Taft parameters [13]. These wrinkled and holed shapes were already observed by SEM on *S. cerevisiae* cells grown in [Emim][OAc] and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] [17], whereas Liu et al. [32] described for the yeast *Geotrichum fermentans* grown in presence of [Emim][OAc] the formation of polymer fibers that surrounded the cells [32]. However, such fundamental studies on ILs remain rare and require further investigations to generalize the IL impact on yeasts which seems to be species-dependent.

In YMD medium, *K. marxianus* tolerated IL additions up to 2% for [Emim][OAc] or 6% for [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], and no growth was anymore observed above these values. Below these concentrations, specific imidazolium IL concentrations added to the growth medium could enhance ethanolic yields significantly in *K. marxianus*: +22% for 1% [Emim][OAc] or +34% for 3% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] addition. Thus, *K. marxianus* better tolerated both ILs without previous adaptation than the model yeast *S. cerevisiae* which supported only 0.5% [Emim][OAc] or 1% [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] [17], but both species showed very similar behaviors despite metabolic divergences as *S. cerevisiae* is Crabtree-positive and *K. marxianus* is Crabtree-negative [14]. The increase in ethanol yields seemed to be linked to the oxygen limitation [14,15] induced by IL additions which modified the metabolic status from respiration to fermentation.

Then we applied the fermentation of *K. marxianus* on raw LCBs pretreated with [Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] which induced a partial selective delignification (up to -20% depending on the conditions). The lignin removal after a pretreatment with [Emim][OAc] was already observed on sugarcane bagasse [33] and switchgrass [34]. The only exception was for the oak sawdust pretreated with [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] where no delignification could be evidenced. However, this particular condition gave also the lowest glucose yield after enzymatic hydrolysis (32.1%) compared to the other ones (between 49.3% and 59.3%) and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] seemed less efficient on deconstructing hardwood sawdust, in accordance with literature [4,13]. Glucose yields obtained after IL pretreatment and enzymatic hydrolysis are closely linked to the experimental conditions: the initial LCB and the cellulosic percentage, the IL nature (commercially provided or lab-synthesized, presence of impurities), the substrate loading rate, the pretreatment temperature and duration, the enzyme origin (pure enzyme or enzymatic preparation containing several hydrolytic activities)... [4,6,12,13,20,21]. Some authors reported very high enzymatic performances after [Emim][OAc] pretreatment, such as 98.2% glucose yield on sugarcane bagasse [33] or 96% on switchgrass [34], but other works are weaker: 40% glucose yield on wheat straw [35], 34.8% on oak and 40.7% on spruce [21], pointing the importance of optimizing all the pretreatment parameters to the lignocellulosic substrate.

When *K. marxianus* was grown on LCB cellulase hydrolyzates, no major inhibition was observed by the other components of the woody biomasses: lignin, hemicellulose, or extractives, or by a co-product issued from the IL pretreatment or the hydrolysis step, which could sometimes prevent the ethanolic fermentation [10,32,36,37]. An ethanolic production occurred in all the tested conditions regardless of the LCB (model cellulose, spruce sawdust, or oak sawdust) or the IL used for pretreatment ([Emim][OAc] or [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]). Ethanolic yields were multiplied by a factor 2.2 and 2.6 for a cellulose pretreatment with [Emim][OAc] and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], respectively compared to the untreated condition. When applied to industrial sawdusts, the IL pretreatments gave results dependent to the wood species: the spruce sawdust (softwood) behaved identically with the two ILs and ethanol yields were increased by a factor 2.2 for the [Emim][OAc]-pretreatment and 2.4 for the [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>]-pretreatment, whereas the oak sawdust (hardwood) pretreated with [Emim][OAc] led to the highest increase by a factor 3.9 compared to the untreated condition, while [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] generated a smaller raise by a factor 1.8. These results point the influence of substrate architecture on the IL pretreatment efficiency, in agreement with hypotheses from previous studies [4,13,20,21], showing again the difficulty to generalize the impacts of ILs on initial LCB, hydrolytic enzymes and fermentative cells.

The *K. marxianus* fermentation yielded 0.42 and 0.43 g ethanol/g glucose for spruce pretreated with [Emim][OAc] and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] respectively, and 0.43 and 0.36 for oak pretreated with [Emim][OAc] and [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] respectively. Here again the lowest efficiency of [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>] pretreatment on hardwood was evidenced. The ethanolic yields obtained from *K. marxianus* fermentation in presence of low IL concentrations were comparable to those from the model yeast *S. cerevisiae*. Linqueo et al. [38] found a yield of 0.134 g ethanol/g glucose on *Eucalyptus globulus* residues pretreated with 1-*N*-ethyl-3-methylimidazolium chloride [Emim][Cl] and Li et al. [35] obtained 0.43 g ethanol/g glucose on switch grass pretreated with 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate [Emim][DEP]. Thus, *K. marxianus* could be a good alternative to *S. cerevisiae* model ethanologenic microorganism.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals

Ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [Emim][OAc] and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], were acquired from Solvionic SA (Veniole, France), with purity higher than 98%. The other chemicals used were previously described [17].

### 4.2. Strain and Culture Conditions

The yeast strain was *K. marxianus* UMIP 2234.94 from the Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (equivalent to ATCC 8554 or CBS 5795). The growth medium was the Yeast-Malt-Dextrose (YMD) medium: yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, glucose 20 g/L, pH 4.8, eventually solidified by agar 20 g/L, and sterilized at 121 °C for 20 min. The medium Yeast-Malt (YM) was identical to YMD without glucose. The preculture and culture conditions were identical to those already described [17], except temperature which was 35 °C. All the experiments were realized at least twice.

### 4.3. Lignocellulosic Biomasses (LCBs)

The model cellulose was the high-purity long fiber cellulose from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Industrial sawdusts of oak (*Quercus petra*) and spruce (*Picea abies*) were kindly provided by the industry SARL Husson Paul (Bathelémont, Lorraine, France) [13,21]. The composition of spruce and oak sawdusts were determined as previously described [13,21].

### 4.4. Morphology Observations

Microscopic preparations were performed according to a protocol described in Mehmood et al. [17]. The yeast morphology was observed on a Philips ESEM-FEG XL30 Scanning Electron Microscope (SEM) (FEI, Eindhoven, The Netherlands) in a high vacuum mode.

### 4.5. Glucose and Ethanol Quantification

Glucose and ethanol concentrations were determined by high-performance liquid chromatography in an Ultimate 3000 chromatograph equipped with a refractive index detector, HyperREZ XP Carbohydrate H<sup>+</sup>-Counterion column (300 × 7.7 mm) and pre-column (50 × 7.7 mm), all from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). The temperature was maintained at 40 °C for the pre-column and 65 °C for the column. The mobile phase was deionized water at a flow rate of 0.6 mL·min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 µL.

### 4.6. Oxygen Transfer Rate (OTR) and Carbon Dioxide Transfer Rate (CTR) Measurements

On-line measurements of the OTR and CTR in shaken flasks were carried out in a Respiratory Activity Monitoring System (RAMOS) as previously described [17,39].

#### 4.7. IL Pretreatment of LCBs

Pretreatment of LCBs (long fiber cellulose, spruce sawdust, or oak sawdust) with imidazolium ILs was realized as already described [13,20,21], except temperature which was here 45 °C. After the pretreatment step, the LCB was precipitated by adding ultra-pure water.

#### 4.8. Enzymatic Hydrolysis of LCBs

The hydrolysis of LCBs pretreated with ILs or not was realized with the cellulase from *Trichoderma reesei* (EC 3.2.1.4) during 80 h in acetate buffer (50 mM, pH 4.8): one unit liberates 1.0 µmol of glucose from cellulose in 1 h at pH 5.0 at 37 °C, from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The enzymatic hydrolysis protocol and the calculation of glucose yields were previously described [13,20,21]. After the enzymatic hydrolysis, the reaction medium was centrifuged and the liquid fraction rich in glucose was recovered for ethanolic fermentation.

#### 4.9. Fermentation of Enzymatically Hydrolysed LCBs

The liquid fraction issued from enzymatic hydrolysis was sterilized by autoclave and transferred in an Erlenmeyer flask. A concentrate YM medium was added in the goal to obtain a final medium containing YM components at the good final value, i.e., yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, pH 4.8. A mid-log phase preculture of *K. marxianus* cells was then inoculated to start the culture.

### 5. Conclusions

*K. marxianus* is an emerging yeast offering huge biotechnological potential, from biofuels to heterologous protein production. Our results highlighted that *K. marxianus* is an excellent candidate for a prospective one-pot process from LCB to second-generation bioethanol grouping IL pretreatment, enzymatic hydrolysis and ethanolic fermentation. However, future lignocellulosic biorefinery still needs a deeper understanding of the mechanisms implied in IL toxicity for fermentative cells to further design rational genetically modified microorganisms with good IL-tolerance and high ethanolic yield ability.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/887/s1>.

**Acknowledgments:** We are grateful to the Conseil Régional de Picardie/Hauts de France and the European Fund of Regional Development for funding this work (SISAF project). We are very thankful to Frederic Nadaud from the Platform of Electron Microscopy of the University of Technology Compiègne, France, for SEM analysis. We thank the Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur for providing the *K. marxianus* strain.

**Author Contributions:** Nasir Mehmood, Eric Husson and Isabelle Gosselin conceived and designed the experiments; Nasir Mehmood, Ranim Alayoubi, Isabelle Gosselin and Cédric Jacquard performed the experiments; Nasir Mehmood, Eric Husson, Jochen Büchs and Isabelle Gosselin analyzed the data; Eric Husson, Jochen Büchs, Catherine Sarazin and Isabelle Gosselin wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

CDW	Cell Dry Weight
CTR	Carbon Dioxide Transfer Rate
[Emim][OAc]	1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate
[Emim][MeO(H)PO <sub>2</sub> ]	1-Ethyl-3-methylimidazolium Methylphosphonate
IL	Ionic Liquid
LCB	Ligno Cellulosic Biomass
OTR	Oxygen Transfer Rate
RAMOS	Respiratory Activity Monitoring System
SEM	Scanning Electron Microscopy
SHF	Separate Hydrolysis and Fermentation

YM Yeast-Malt  
YMD Yeast-Malt-Dextrose

## References

- Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manag.* **2011**, *52*, 858–875. [[CrossRef](#)]
- Valdivia, M.; Galan, J.L.; Laffarga, J.; Ramos, J.-L. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microb. Biotechnol.* **2016**, *9*, 585–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramos, J.L.; García-Lorente, F.; Valdivia, M.; Duque, E. Green biofuels and bioproducts: Bases for sustainability analysis. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1111–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Badgajar, K.C.; Bhanage, B.M. Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. *Bioresour. Technol.* **2015**, *178*, 2–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jönsson, L.J.; Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* **2016**, *199*, 103–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cao, Y.; Zhang, R.; Cheng, T.; Guo, J.; Xian, M.; Liu, H. Imidazolium-based ionic liquids for cellulose pretreatment: Recent progresses and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 521–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sitepu, I.R.; Shi, S.; Simmons, B.A.; Singer, S.W.; Boundy-Mills, K.; Simmons, C.W. Yeast tolerance to the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 1286–1294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dickinson, Q.; Bottoms, S.; Hinchman, L.; McIlwain, S.; Li, S.; Myers, C.L.; Boone, C.; Coon, J.J.; Hebert, A.; Sato, T.K.; et al. Mechanism of imidazolium ionic liquids toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and rational engineering of a tolerant, xylose fermenting strain. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ouellet, M.; Datta, S.; Dibble, D.C.; Tamrakar, P.R.; Benke, P.I.; Li, C.; Singh, S.; Sale, K.L.; Adams, P.D.; Keasling, J.D.; et al. Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2743–2749. [[CrossRef](#)]
- Santos, A.G.; Ribeiro, B.D.; Alviano, D.S.; Coelho, M.A.Z. Toxicity of ionic liquids toward microorganisms interesting to the food industry. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 37157–37163. [[CrossRef](#)]
- Isik, M.; Sardon, H.; Mecerreyes, D. Ionic liquids and cellulose: Dissolution, chemical modification and preparation of new cellulosic materials. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 11922–11940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Olivier-Bourbigou, H.; Magna, L.; Morvan, D. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Appl. Catal. A Gen.* **2010**, *373*, 1–56. [[CrossRef](#)]
- Auxenfans, T.; Husson, E.; Sarazin, C. Simultaneous pretreatment and enzymatic saccharification of (ligno)celluloses in aqueous-ionic liquid media: A compromise. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *117*, 77–86. [[CrossRef](#)]
- Fonseca, G.G.; Heinzle, E.; Wittmann, C.; Gombert, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 339–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fonseca, G.G.; de Carvalho, N.M.; Gombert, A.K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 5055–5067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Radecka, D.; Mukherjee, V.; Mateo, R.Q.; Stojiljkovic, M.; Foulquié-Moreno, M.R.; Thevelein, J.M. Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*, fov053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mehmood, N.; Husson, E.; Jacquard, C.; Wewetzer, S.; Büchs, J.; Sarazin, C.; Gosselin, I. Impact of two ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate, on *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic, physiologic, and morphological investigations. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Anderlei, T.; Büchs, J. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem. Eng. J.* **2001**, *7*, 157–162. [[CrossRef](#)]
- Meier, K.; Klöckner, W.; Bonhage, B.; Antonov, E.; Regestein, L.; Büchs, J. Correlation for the maximum oxygen transfer capacity in shake flasks for a wide range of operating conditions and for different culture media. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *109*, 228–235. [[CrossRef](#)]

20. Husson, E.; Buchoux, S.; Avondo, C.; Cailleu, D.; Djellab, K.; Gosselin, I.; Wattraint, O.; Sarazin, C. Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses: Contribution of CP-MAS <sup>13</sup>C NMR and SEM. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 7335–7342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Auxenfans, T.; Buchoux, S.; Larcher, D.; Husson, G.; Husson, E.; Sarazin, C. Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: Recycled ionic liquids pretreatments. *Energy Convers. Manag.* **2014**, *88*, 1094–1103. [[CrossRef](#)]
22. Petersen, R.C. The chemical composition of wood. In *The Chemistry of Solid Wood*; Rowell, R.M., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1984; Chapter 2; pp. 57–126.
23. Nakashima, K.; Yamaguchi, K.; Taniguchi, N.; Arai, S.; Yamada, R.; Katahira, S.; Ishida, N.; Takahashi, H.; Ogino, C.; Kondo, A. Direct bioethanol production from cellulose by the combination of cellulase-displaying yeast and ionic liquid pretreatment. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2948–2953. [[CrossRef](#)]
24. Blumer-Schuetz, S.E.; Brown, S.D.; Sander, K.B.; Bayer, E.A.; Kataeva, I.; Zurawski, J.V.; Conway, J.M.; Adams, M.W.W.; Kelly, R.M. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 393–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tanaka, T.; Kondo, A. Cell surface engineering of industrial microorganisms for biorefining applications. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1403–1411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Reddy, A.P.; Simmons, C.W.; Claypool, J.; Jabusch, L.; Burd, H.; Hadi, M.Z.; Simmons, B.A.; Singer, S.W.; VanderGheynst, J.S. Thermophilic enrichment of microbial communities in the presence of the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 1362–1370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Frederix, M.; Hütter, K.; Leu, J.; Batth, T.S.; Turner, W.J.; Rüeegg, T.L.; Blanch, H.W.; Simmons, B.A.; Adams, P.D.; Keasling, J.D.; et al. Development of a native *Escherichia coli* induction system for ionic liquid tolerance. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rüeegg, T.L.; Kim, E.-M.; Simmons, B.A.; Keasling, J.D.; Singer, S.W.; Soon Lee, T.; Thelen, M.P. An auto-inducible mechanism for ionic liquid resistance in microbial biofuel production. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Portillo, M.D.C.; Saadeddin, A. Recent trends in ionic liquid (IL) tolerant enzymes and microorganisms for biomass conversion. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2015**, *35*, 294–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Yu, C.; Simmons, B.A.; Singer, S.W.; Thelen, M.P.; VanderGheynst, J.S. Ionic liquid-tolerant microorganisms and microbial communities for lignocellulose conversion to bioproducts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 10237–10249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lesage, G.; Bussey, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 317–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Liu, L.-P.; Zong, M.-H.; Linhardt, R.J.; Lou, W.-Y.; Li, N.; Huang, C.; Wu, H. Mechanistic insights into the effect of imidazolium ionic liquid on lipid production by *Geotrichum fermentans*. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Da Silva, A.S.A.; Lee, S.-H.; Endo, T.; Bon, E.P.S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][Ac]). *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10505–10509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Li, C.; Knierim, B.; Manisseri, C.; Arora, R.; Scheller, H.V.; Auer, M.; Vogel, K.P.; Simmons, B.A.; Singh, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4900–4906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Li, Q.; He, Y.-C.; Xian, M.; Jun, G.; Xu, X.; Yang, J.-M.; Li, L.-Z. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3570–3575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Binder, J.B.; Raines, R.T. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4516–4521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Soudham, V.P.; Raut, D.G.; Anugwom, I.; Bradberg, T.; Larsson, C.; Mikkola, J.-P. Coupled enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation: Ionic liquid pretreatment for enhanced yields. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Lienqueo, M.E.; Ravanal, M.C.; Pezoa-Conte, R.; Cortínez, V.; Martínez, L.; Niklitschek, T.; Salazar, O.; Carmona, R.; García, A.; Hyvärinen, S.; et al. Second generation bioethanol from *Eucalyptus globulus* Labill and *Nothofagus pumilio*: Ionic liquid pretreatment boosts the yields. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *80*, 148–155. [[CrossRef](#)]
39. Anderlei, T.; Zang, W.; Papaspyrou, M.; Büchs, J. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* **2004**, *17*, 187–194. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Cellulose



Spruce sawdust



Oak sawdust



Low IL-pretreatment:  
[Emim][OAc]  
45 °C  
40 min



Ethanol yield  
increases 2.6 to  
3.9 times

**Highlights:**

[Emim][OAc]-pretreatment at 45 °C was assayed on 3 (ligno)cellulosic substrates.

The soft IL-pretreatment disorganized the lignocellulosic architectures.

Cellulases accessibility increased and enzymatic hydrolysis yields improved.

Ethanol yields were 2.6 to 3.9 higher after the [Emim][OAc]-pretreatment at 45 °C.

This low energy demand IL-pretreatment is efficient on softwood and hardwood.

1 LOW TEMPERATURE IONIC LIQUID PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC  
2 BIOMASS TO ENHANCE BIOETHANOL YIELD

3  
4 Ranim Alayoubi<sup>a,b</sup>, Nasir Mehmood<sup>a</sup>, Eric Husson<sup>a</sup>, Achraf Kouzayha<sup>b</sup>, Mohamad  
5 Tabcheh<sup>b</sup>, Ludovic Chaveriat<sup>c</sup>, Catherine Sarazin<sup>a</sup> and Isabelle Gosselin<sup>a\*</sup>

6  
7 <sup>a</sup> Unité Génie Enzymatique et Cellulaire, CNRS UMR 7025, Université de Picardie  
8 Jules Verne, Amiens, France

9 <sup>b</sup> Laboratoire de Biotechnologies Appliquées : Biomolécules, Biothérapies et  
10 Bioprocédés LBA3B, Centre AZM de Biotechnologie, Université Libanaise, Tripoli,  
11 Liban

12 <sup>c</sup> Unité Transformations & Agroressources, EA7519, Université d'Artois, UniLasalle,  
13 Béthune, France

14  
15 \* Corresponding author.

16 E-mail address: [isabelle.gosselin@u-picardie.fr](mailto:isabelle.gosselin@u-picardie.fr) (I. Gosselin).

17  
18 **Abstract:** Among pretreatments existing to overcome the recalcitrance of the  
19 lignocellulosic biomass, imidazolium-based ionic liquids (ILs) are gaining interest to  
20 make cellulose more accessible to hydrolytic enzymes and generate fermentable  
21 sugars that are finally converted into ethanol by microbial fermentation. However,  
22 these pretreatments are usually implemented at a temperature between 80 °C and  
23 160 °C raising realistically an energy demand problem. Here, we present an eco-  
24 friendly pretreatment strategy using the 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate  
25 [Emim][OAc] IL at 45 °C. This energy efficient method was studied on three  
26 substrates: a model cellulose and two industrial forest residues, spruce and oak  
27 sawdusts. The viscosity of the three samples in [Emim][OAc] were followed  
28 depending on the temperature. The structures of the pretreated substrates were  
29 analyzed by scanning electron microscopy and by Fourier transform infrared spectra.  
30 Then the pretreated samples were submitted to enzymatic hydrolysis catalyzed by  
31 cellulases from *Trichoderma reesei* and to ethanolic fermentation by the yeast  
32 *Saccharomyces cerevisiae*. The ethanolic yields obtained from (ligno)cellulosic  
33 substrates were 2.6 to 3.9 times higher after the soft pretreatment with [Emim][OAc].  
34 Thus, [Emim][OAc]-pretreatment at low temperature is a promising gentle method for

35 LCB valorization into biofuels.

36

37 **Highlights:**

38 [Emim][OAc]-pretreatment at 45 °C was assayed on 3 (ligno)cellulosic substrates.

39 The soft IL-pretreatment disorganized the lignocellulosic architectures.

40 Cellulases accessibility increased and enzymatic hydrolysis yields improved.

41 Ethanolic yields were 2.6 to 3.9 higher after the [Emim][OAc]-pretreatment at 45 °C.

42 This low energy demand IL-pretreatment is efficient on softwood and hardwood.

43

44 **Keywords:** Lignocellulosic biomass, ionic liquid, soft pretreatment, biofuels,  
45 fermentation

46

47 **1. Introduction**

48 Lignocellulosic biomass (LCB) is nowadays considered as one of the most  
49 promising feedstocks to produce sustainable fuels and chemicals, and decrease the  
50 fossil energy dependency as a complement to other alternatives [1-4]. LCB includes  
51 a wide variety of raw materials that can be classified into four groups depending on  
52 their origin, composition and structure: forest materials, agricultural residues, energy  
53 crops and municipal wastes [5,6]. LCB offers several advantages like being the most  
54 abundant biomass on Earth, sustainable, renewable and not-competitive with food or  
55 feed production [1-6]. Moreover, utilizing renewable carbon from LCB for materials,  
56 chemicals and energy reduces the greenhouse gas emissions and limits the global  
57 climate warming [2,3,7].

58 The LCB is mainly constituted of 3 biopolymers: cellulose (40-60%),  
59 hemicellulose (20-30%) and lignin (15-20%) [5,8]. The former ones are both  
60 polysaccharides that could be hydrolyzed in simple sugars by enzymes and  
61 fermented in bioethanol by microorganisms. But extensive inter- and intra-molecular  
62 hydrogen bonds among the cellulose molecules result in microfibrils with crystalline  
63 and highly ordered regions which are further intertwined to the hemicellulose and the  
64 lignin polymers, delivering to the LCB a complex and robust architecture, recalcitrant  
65 to degradation [3-5,8]. Hence, a pretreatment step is required to disrupt the LCB  
66 tridimensional architecture and render cellulose more accessible to hydrolytic  
67 enzymes [3-5,8]. Several pretreatment technologies exist which often use  
68 environmentally harmful chemicals in energivore and corrosive processes, in addition

69 to degrading fermentescible sugars and producing by-products inhibitory or toxic for  
70 downstream enzymatic and/or fermentative steps [9-11].

71 From the last decades, room temperature ionic liquids (RTILs) have emerged  
72 as promising non-conventional solvents for the LCB pretreatment by solubilizing,  
73 disorganizing and/or fractioning LCB and increasing cellulose enzymatic digestibility  
74 [12-18]. They are organic salts, composed of an organic cation and an organic or  
75 inorganic anion, liquid at temperatures below 100 °C, non-volatile, non-flammable,  
76 with high thermal and chemical stability [12-18]. Among RTILs, one is recognized as  
77 the most suitable solvent for lignocellulose dissolution in addition to exhibiting a non-  
78 corrosivity: the 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [Emim][OAc] [3,19] and this IL is  
79 widely used for the pretreatment of various LCBs like switchgrass, *Eucalyptus*  
80 *globulus*, southern yellow pine, red oak, cotton stalks, hemp stalks and acacia  
81 pruning, *Miscanthus x giganteus*, wheat straw... [20-24]. However common LCB  
82 pretreatments with [Emim][OAc] IL are carried out at temperatures ranging from 80  
83 °C to 160 °C [3,8,10] and only a few reports study IL pretreatment at temperature  
84 inferior to 80 °C [14,22,25-29]. But this point is contradictory to a green and  
85 sustainable LCB valorization process where energy cost should be reduced and high  
86 pretreatment temperature should be avoided [8,30].

87 Some authors make a distinction between the IL use at high or low temperature  
88 and deal with IL pretreatment when temperature is above 80 °C and IL activation  
89 when temperature is below 80 °C, suggesting that high temperature could lead to a  
90 degradation and a removal of lignin and hemicellulose whereas low temperature  
91 induces a recovery of all the lignocellulose components and minimizes the  
92 degradation in preserving the structural integrity of constitutive polymers  
93 [25,26,28,29]. But more commonly, authors don't make any difference and use the  
94 term pretreatment even at low temperature [14,22,27,31,32] and we will here fit in  
95 this category.

96 Although IL-pretreatment step is followed by extensive washings, residual IL  
97 may remain entrapped in the pretreated LCB (from 0.1 to 10% depending on the LCB  
98 and the IL), which could induce deactivation effects on hydrolytic enzymes [1,25,33-  
99 35] or toxicity to fermentative yeasts [17,36-39].

100 Herein, the impact of [Emim][OAc] pretreatment at low temperature, *i.e.* 45 °C,  
101 was investigated on the solubility and the morphology of three substrates: the model  
102 cellulose and two forest industrial LCBs, spruce sawdust and oak sawdust, in relation

103 to the viscosity of the different samples in IL. The sequential enzymatic hydrolysis  
104 and yeast fermentation process (SHF Sequential Hydrolysis and Fermentation) was  
105 then applied to the [Emim][OAc]-pretreated substrates to observe the efficiency of a  
106 pretreatment at temperature as low as 45 °C in the production of second generation  
107 bioethanol. The originality of the study lies in the demonstration of the impact of a  
108 very energy-efficient IL pretreatment on all the various stages of the global process of  
109 LCB valorization into ethanol.

110

## 111 **2. Materials and methods**

### 112 *2.1 Chemicals*

113 Yeast extract, peptone, and malt extract were obtained from Merck (Darmstadt,  
114 Germany) while glucose, and agar were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim,  
115 Germany). The 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [Emim][OAc] was acquired from  
116 Solvionic SA (Veniole, France), with purity higher than 98%.

117

### 118 *2.2 Strain and culture conditions*

119 The yeast strain used in this study was *S. cerevisiae* Type II from Sigma-Aldrich  
120 (Steinheim, Germany). The growth medium was the Yeast-Malt-Dextrose (YMD)  
121 medium: yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, glucose 20 g/L, pH  
122 4.8, eventually solidified by agar 20 g/L, and sterilized at 121 °C for 20 min. The  
123 medium Yeast-Malt (YM) was identical to YMD but without glucose. The *S.*  
124 *cerevisiae* strain was conserved at +4 °C onto YMD plate. For each experiment, one  
125 yeast colony was used to inoculate a 50 mL YMD preculture. The preculture  
126 conditions were 30 °C at 150 rpm. At mid-log phase, preculture was used to inoculate  
127 the culture at an initial optical density at 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) of 0.25 into a 250 mL non-  
128 baffled flask. The yeast growth was routinely followed by measuring  $OD_{600nm}$  values.

129

### 130 *2.3 (Ligno)cellulosic biomasses (LCBs)*

131 The model cellulose was the high-purity cotton long fiber cellulose from Sigma-  
132 Aldrich (sizes ranging from 125 to 400  $\mu$ m) (Steinheim, Germany). Industrial  
133 sawdusts of spruce (*Picea abies*) and oak (*Quercus petra*) were kindly provided by  
134 the forest industry SARL Husson Paul (Bathelémont, Lorraine, France). The collected  
135 sawdusts were milled with a planetary ball miller (Retsch PM400) for 20 min at 300  
136 rpm to achieve a size of less than 0.8 mm [16]. The composition of spruce and oak

137 sawdusts was determined as previously described [16,33].

138

#### 139 *2.4 Glucose and ethanol quantification*

140 The concentrations of glucose and ethanol were monitored by high-  
141 performance liquid chromatography in an Ultimate 3000 chromatograph equipped  
142 with a refractive index detector, HyperREZ XP Carbohydrate H<sup>+</sup>-Counterion column  
143 (300 x 7.7 mm) and pre-column (50 x 7.7 mm), all from ThermoFisher Scientific  
144 (Waltham, MA, USA). The temperature was maintained at 40 °C for the pre-column  
145 and 65 °C for the column. Elution was carried out at a flow rate of 0.6 mL/min with  
146 deionized water and the injection volume was 20 µL. Quantification was based on  
147 calibration curves established using standard glucose and ethanol.

148

#### 149 *2.5 IL pretreatment of LCBs*

150 LCBs were subjected to IL pretreatment according to the standard described  
151 procedure [13,14], except that the temperature was 45 °C. Briefly LCBs (2% w/v)  
152 were added to 10 mL of [Emim][OAc] and incubated in an oil bath at 45 °C with  
153 vigorous stirring for 40 min. After incubation, the pretreated LCB was precipitated by  
154 adding ultrapure water (2:1 v/v water/IL) to the mixture then centrifuged (10,733 g, 20  
155 min, 4 °C). The solid fraction were collected by vacuum filtration, thoroughly washed  
156 with ultrapure water and then freeze-dried.

157

#### 158 *2.6 Enzymatic hydrolysis of LCBs*

159 The hydrolysis of LCBs substrates (non-pretreated or pretreated with  
160 [Emim][OAc]) was performed with the cellulases from *Trichoderma reesei* (EC  
161 3.2.1.4) for 80 h at 40 °C in acetate buffer (50 mM, pH 4.8): one unit liberates 1.0  
162 µmol of glucose from cellulose in 1 h at pH 5.0 at 37 °C, from Sigma-Aldrich  
163 (Steinheim, Germany). After the enzymatic hydrolysis, the reaction medium was  
164 centrifuged and the liquid fraction rich in glucose was recovered for ethanolic  
165 fermentation. All the experiments were realized at least twice.

166 The conversion of model cellulose into glucose was determined as described by  
167 the equation below, taking into account the difference between the molar mass of  
168 free glucose and glucose in a polysaccharide, *i.e.* the ratio 162/180:

$$169 Y_{\text{Glucose}} (\%) = 100 \times [\text{Glucose} (\text{g.L}^{-1}) \times 162/180] / [\text{Cellulose}_{\text{initial}} (\text{g.L}^{-1})]$$

170

171 For LCB substrates (spruce and oak sawdusts), the conversion of constitutive  
172 cellulose into glucose was determined by considering the initial content of cellulose in  
173 the substrate:

$$174 Y_{\text{Glucose}} (\%) = 100 \times [\text{Glucose (g.L}^{-1}) \times 162/180] / [\text{LCB}_{\text{initial}} (\text{g.L}^{-1}) \times \text{Cellulose} \\ 175 \text{content}_{\text{initial}} (\%)]$$

176

### 177 *2.7 Fermentation of the LCB enzymatic hydrolysates*

178 After centrifugation, the supernatant derived from enzymatic hydrolysis was  
179 collected and sterilized by autoclave at 121 °C for 20 minutes and transferred in an  
180 Erlenmeyer flask. A concentrate YM medium was added in the goal to obtain a final  
181 medium containing YM components at the right final value, *i.e.* yeast extract 3 g/L,  
182 malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, pH 4.8. Then, a mid-log phase preculture of *S.*  
183 *cerevisiae* was used to inoculate the culture. The culture conditions were 30 °C at  
184 150 rpm. All the experiments were realized at least twice.

185 The ethanolic yield was calculated by considering the maximum theoretical  
186 ethanol formation (2 mol) from glucose (1 mol) equal to 51.1% as follow:

$$187 Y_{\text{Ethanol}} (\%) = 100 \times [\text{Ethanol (g.L}^{-1})] / [\text{Glucose}_{\text{initial}} (\text{g.L}^{-1}) \times 0.511].$$

188

### 189 *2.8 Scanning Electron Microscopy (SEM)*

190 Cellulose and LCBs (spruce and oak sawdusts) were metallized by gold with a  
191 thickness of 5 nm with a rotary pumped sputter coater (Quorum Q150RS). These  
192 samples were further observed under SEM in high vacuum mode by using  
193 Secondary Electron (SE) detector.

194

### 195 *2.9 Fourier Transform Infra-Red (FT-IR)*

196 FT-IR spectra of pure cellulose and sawdust samples were obtained using a  
197 Shimadzu FT-IR 8400S Spectrometer in the Attenuated Total Reflectance (ATR)  
198 analysis mode. Spectra were recorded from 4000 to 600 cm<sup>-1</sup> with 4 cm<sup>-1</sup> resolution  
199 for 128 scans.

200

### 201 *2.10 Viscosity*

202 Viscosity measurements of [Emim][OAc] and samples in [Emim][OAc] were  
203 carried out using a Malvern Kinexus Pro viscometer. The temperature of the sample  
204 was maintained to ± 0.1°C via a Kinexus Passive Heat Exchanger (KNX25000) within

205  $\pm 0.2^\circ\text{C}$  variation. The overall uncertainty of the dynamic viscosity measurement was  
206 estimated to be  $\pm 3\%$ .

207

### 208 **3. Results and discussion**

209

#### 210 *3.1 (Ligno)cellulosic substrates*

211 Three substrates were studied: the model long fiber cellulose and two industrial  
212 wood LCBs, spruce and oak sawdusts. The compositions of the two woody sawdusts  
213 are presented in Table 1.

214

215 **Table 1**

216 Chemical compositions of lignocellulosic biomasses<sup>a</sup>.

Lignocellulosic biomass	Cellulose	Lignin	Xylose	Arabinose	Extractives
Spruce sawdust	55.4 $\pm$ 1.3	28.7 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 1.0
Oak sawdust	44.7 $\pm$ 0.3	26.7 $\pm$ 0.8	14.8 $\pm$ 1.3	1.2 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 1.0

217

218 <sup>a</sup>Compositions are expressed as percentages of residues [33].

219

220 Spruce sawdust contained a larger part of cellulose (55.4%) compared to oak  
221 sawdust (44.7%). Xylose and arabinose from hemicellulose was higher in oak  
222 sawdust (total 16.0%) than in spruce sawdust (total 5.6%). The lignin content was  
223 slightly higher in spruce (28.7%) than in oak (26.7%) while the extractives were a bit  
224 lower in spruce (3.3%) than in oak (4.6%). All these data are consistent with the  
225 literature [1,20,40,41]. In addition, all these polymers are organized differently in  
226 softwoods (spruce) and in hardwoods (oak) [20,42], and these two various complex  
227 and compact structures of wood will have repercussions on the action of  
228 [Emim][OAc] during LCB pretreatment.

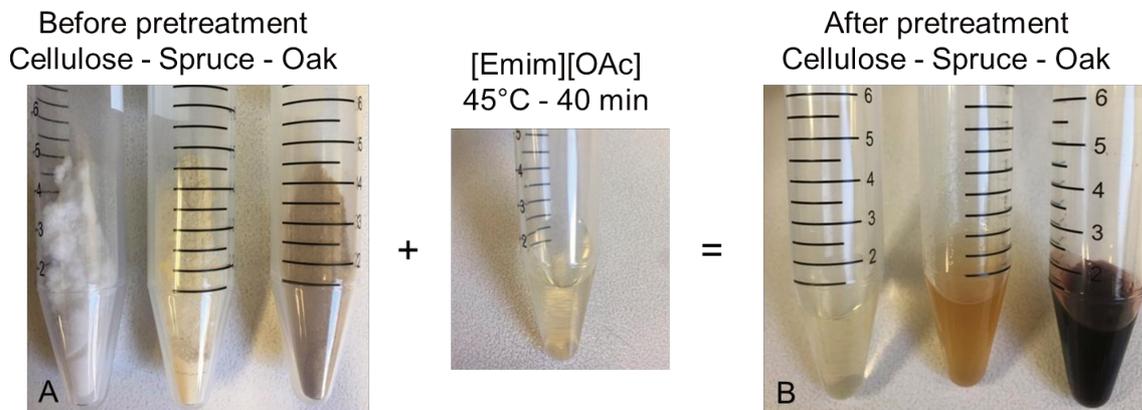
229

#### 230 *3.2 Substrate pretreatment with [Emim][OAc] at 45 °C*

231 Long fiber cellulose, spruce sawdust and oak sawdust were then submitted to a  
232 [Emim][OAc] pretreatment at 45 °C during 40 min at a loading of 2% (w/v).

233 [Emim][OAc] was able to completely dissolve all the three substrates in those  
234 experimental conditions. The obtained solutions (Fig. 1) were homogeneous. The  
235 solution of pure cellulose in [Emim][OAc] led to a clear and transparent aspect

236 whereas the two LCB solutions were hazy. This appearance could be attributed to  
237 the lignin presence in the two sawdusts and was already observed in IL  
238 pretreatments at classical temperature ( $\geq 80$  °C) of woody biomasses [40,43].  
239



240  
241 **Fig. 1.** Long fiber cellulose (left), spruce sawdust (middle) and oak sawdust (right)  
242 before (A) and after (B) [Emim][OAc] pretreatment at 45 °C during 40 min.  
243

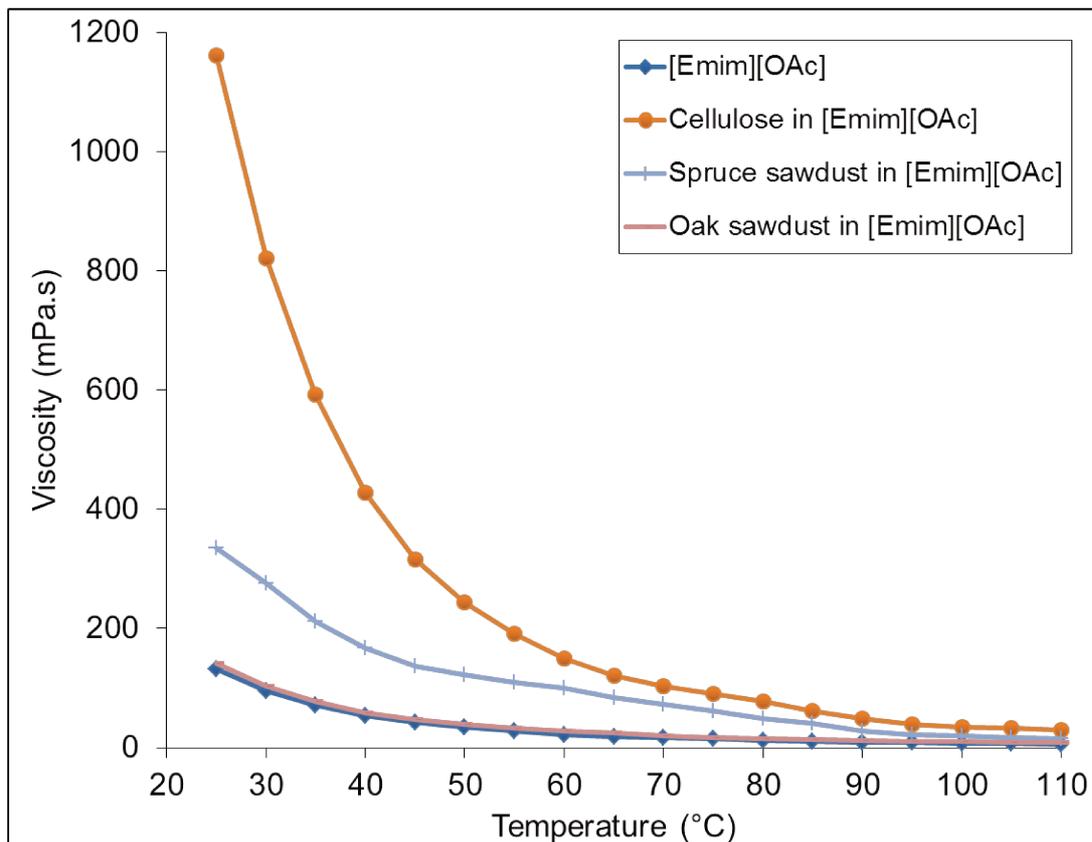
244 The three solutions exhibited different colors. The long fiber cellulose did not  
245 change the color of [Emim][OAc] which remained pale yellow (Fig. 1), but the two  
246 woody sawdusts darkened the [Emim][OAc] solutions. The solution of spruce  
247 sawdust in [Emim][OAc] appeared dark orange and the oak sawdust colored the IL in  
248 deep brown. The intensity of the brown color was independent of the lignin content  
249 as the LCB which colored the most the IL was the oak sawdust with 26.7% of lignin  
250 and not the spruce sawdust with 28.7% of lignin (Table 1). But lignin could wear  
251 numerous colors from yellow to dark brown depending on the LCB sources such as  
252 softwoods, hardwoods or agricultural biomasses [42]. Furthermore, lignin structures  
253 are different in the two sawdusts: in softwood (like spruce) lignin is mainly composed  
254 of guaiacyl units, while in hardwood (like oak) lignin is constituted by guaiacyl and  
255 syringyl units [1] which could influence the color intensity.

256 More, the three solutions showed various viscosities related to the cellulose  
257 content, *i.e.* the solution of pure cellulose in [Emim][OAc] was highly viscous, more  
258 than spruce sawdust (cellulose 55.4%), and oak sawdust which contained the lowest  
259 cellulose percentage (44.7%) was the less viscous.

260

### 261 3.3 Viscosity of the substrates in [Emim][OAc]

262 After having visualized the different viscosities of the three samples in IL, we  
 263 chose to focus on viscosity measurements depending on the temperature. Indeed,  
 264 the ILs are highly viscous fluids [44,45], even if [Emim][OAc] is described as a low  
 265 viscosity IL [10,46,47], and the low temperature is known to increase the IL viscosity  
 266 which can affect the solubilization of LCBs and prevent mass transfer phenomenon  
 267 [8,44,48]. The viscosity values of the [Emim][OAc] IL, and of the three substrates:  
 268 model cellulose, spruce sawdust and oak sawdust, in [Emim][OAc] at a loading  
 269 charge of 2% (w/v) were followed depending on temperature from 25 °C (room  
 270 temperature) to 110 °C which is a classical IL pretreatment temperature [13,14,16,22]  
 271 going through 45 °C which is the pretreatment temperature in here (Fig. 2).  
 272



273  
 274 **Fig. 2.** Viscosity measurements depending on temperature of [Emim][OAc] (◆),  
 275 cellulose in [Emim][OAc] (●), spruce sawdust in [Emim][OAc] (+), and oak sawdust in  
 276 [Emim][OAc] (-). Substrate loadings at 2% (w/v) in [Emim][OAc].

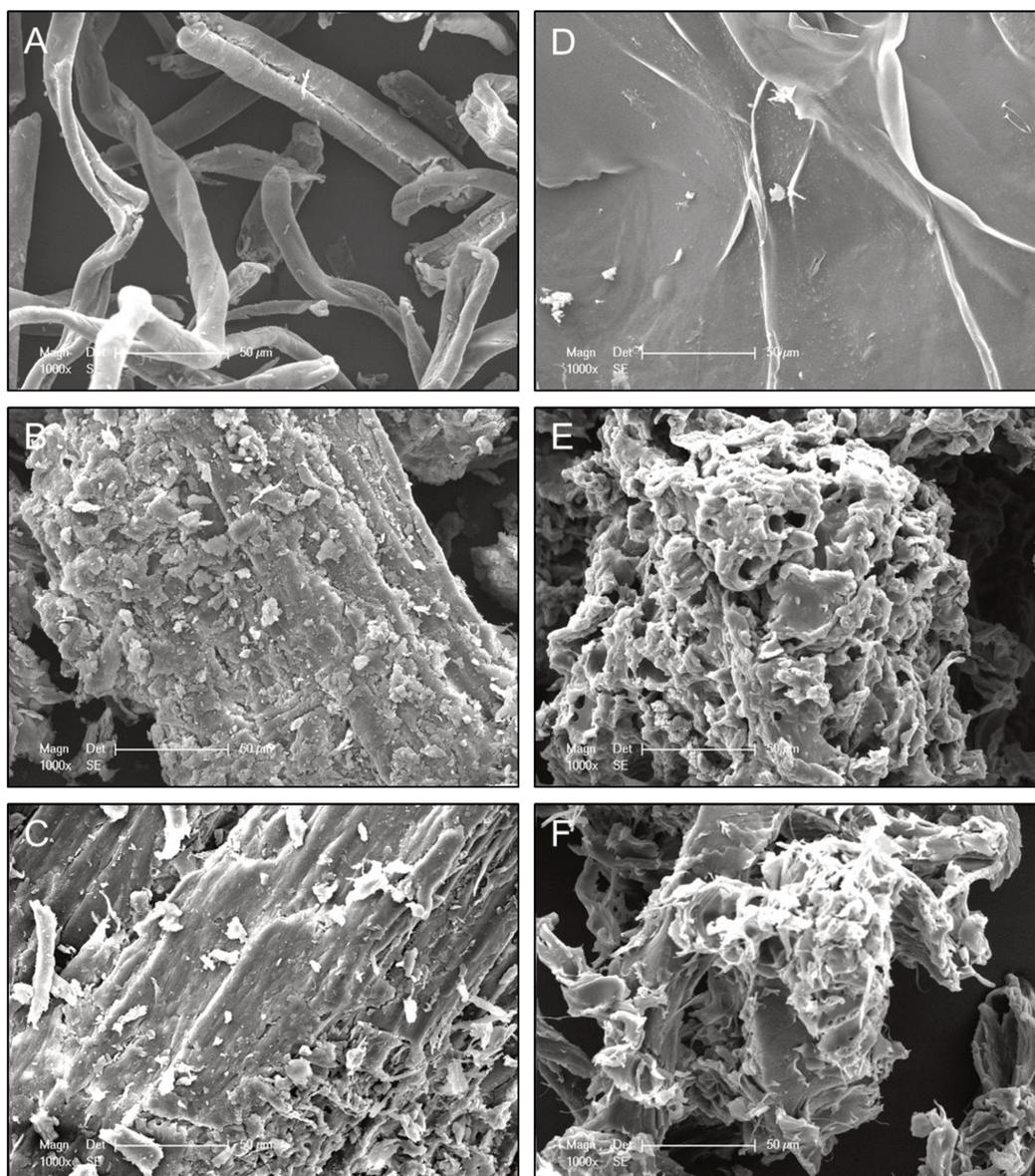
277  
 278 The viscosity of [Emim][OAc] followed an exponential decrease as a function of  
 279 increasing temperature: 131.4 mPa.s at 25 °C, 43.1 mPa.s at 45 °C and 6.2 mPa.s at  
 280 110 °C. These values are in good agreement with the literature [48-50]. The viscosity

281 of the three substrates loaded in [Emim][OAc] presented values higher than the IL  
282 alone, in link with the cellulose content of the substrate: 316.0 mPa.s for model  
283 cellulose, 136.6 mPa.s for spruce sawdust (cellulose 55.4%) and 46.5 mPa.s for oak  
284 sawdust (cellulose 44.7%) at 45 °C. These values confirmed the previous  
285 observations of the solubilized substrates presented in Fig. 1. At 25 °C (room  
286 temperature), viscosity of the samples were significantly higher: 1161.5 mPa.s for  
287 model cellulose, 335.8 mPa.s for spruce sawdust and 140.9 mPa.s for oak sawdust.  
288 Then the viscosity values decreased exponentially as the temperature increased. It is  
289 interesting to notice that oak sawdust which is the LCB with the lesser cellulose  
290 content (44.7%) followed exactly the viscosity curve of the [Emim][OAc] alone,  
291 suggesting that there is a threshold in the LCB cellulose content under which the  
292 addition of LCB into [Emim][OAc] don't induce an increase in viscosity whatever is  
293 the temperature. Altogether these results meant that at the pretreatment temperature  
294 (45 °C), the viscosity of the different samples was just at the feet of the exponential  
295 increase and thus with only a short order of magnitude higher in viscosity compared  
296 to those at 110 °C. It should be kipping in mind that the LCB dissolution process is  
297 quite complex and depends also on other parameters than viscosity (sometimes  
298 interconnected) such as presence of impurities, presence of water, hydrogen bond  
299 donor/acceptor (or acidic) properties of the IL and cellulose or LCB loading [8,44,48].

300

### 301 *3.4 SEM observation of regenerated substrates*

302 After solubilization of the three substrates in [Emim][OAc] at 45 °C, the  
303 pretreated materials were regenerated (precipitated) by addition of an anti-solvent  
304 (ultrapure water) and filtrated. The solid fractions were analyzed by SEM (Fig. 3).



305  
 306 **Fig. 3.** Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs of untreated substrates:  
 307 long fiber cellulose (A), spruce sawdust (B) and oak sawdust (C), and pretreated  
 308 substrates with [Emim][OAc] at 45 °C during 40 min: long fiber cellulose (D), spruce  
 309 sawdust (E) and oak sawdust (F). Bar = 50 µm.

310  
 311 The untreated long fiber cellulose (Fig. 3A) showed individualized microfibrils  
 312 organized in rigid fibers with a diameter inferior to 20 µm. Spruce and oak sawdusts  
 313 (Fig. 3B and 3C) exhibited a compact morphology, more complex and very ordered in  
 314 wood macrofibrils of around 200 µm. Spruce sawdust presented more asperities  
 315 compared to oak which seemed denser with smoother strong fibers. After  
 316 pretreatment with [Emim][OAc] at 45 °C during 40 min, the three regenerated-  
 317 substrates showed a morphology different from the untreated one. For cellulose, no

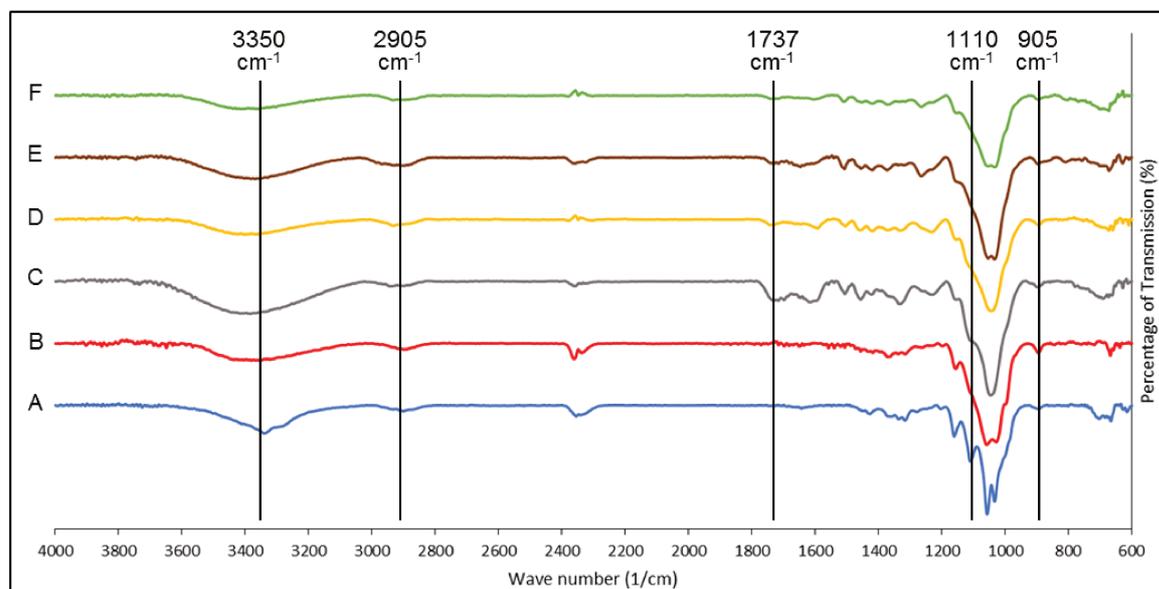
318 fiber was visible anymore (Fig. 3D) and the surface looked like a smooth and  
319 expanded material. The spruce sawdust (Fig. 3E) had a very porous macrostructure,  
320 presenting many small cavities, and the oak sawdust showed a more exploded and  
321 highly cut texture. Thus the pretreatment at low temperature did not prevent the  
322 [Emim][OAc] interactions with (ligno)cellulosic materials and the effect was  
323 comparable to what is classically observed at high temperature, *i.e.* the disruption of  
324 hydrogen bonding in the cellulosic network, the increase of the porosity and the  
325 surface area, and the cleavage of the chemical bonds between lignin and  
326 hemicellulose to disorganize the LCB structure [10,34].

327

### 328 3.5 FTIR structural analyses

329 Structural characterization of the model cellulose and the spruce and oak  
330 sawdusts were realized by FTIR studies before and after [Emim][OAc]-pretreatment  
331 at 45 °C (Fig. 4). The absence of characteristic band assigned to [Emim][OAc] in  
332 FTIR spectra (see supplementary data 1) of IL-pretreated substrates suggested the  
333 efficiency of the washing steps after pretreatment, limiting considerably the presence  
334 of residual IL.

335



336  
337 **Fig. 4.** FTIR spectra of untreated (A) and [Emim][OAc]-pretreated (B) long fiber  
338 cellulose, untreated (C) and [Emim][OAc]-pretreated (D) oak sawdust and untreated  
339 (D) and [Emim][OAc]-pretreated (E) spruce sawdust. Pretreatment with [Emim][OAc]  
340 at 45 °C during 40 min.

341

342 On the FTIR spectra (Fig. 4), the absorption bands centered around  $3350\text{ cm}^{-1}$   
343 (OH stretching) and  $2905\text{ cm}^{-1}$  (CH stretching) were observed whatever were the  
344 samples, untreated or [Emim][OAc]-pretreated. These characteristic bands were  
345 expected from constitutive hemicelluloses, cellulose and lignin in biomass [51].  
346 Concerning the pure cellulose, FTIR spectra (Fig. 4A and 4B) showed that  
347 [Emim][OAc]-pretreatment at  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  seemed to have an impact toward its  
348 supramolecular structure. Indeed, the intensity of the absorption band at  $1110\text{ cm}^{-1}$   
349 (ascribed to “crystalline” cellulose) decreased drastically after pretreatment whereas  
350 the band at  $905\text{ cm}^{-1}$  (ascribed to “amorphous” cellulose) increased. This evidenced  
351 a disruption of the inter/intra chain hydrogen bonds network of cellulose polymer  
352 leading to a higher enzymatic digestibility as previously shown in literature [13]. The  
353 impact of IL-pretreatment on constitutive cellulose was also observed for oak  
354 sawdust (Fig. 4C and 4D) according to previous work [16]. However, this structural  
355 change was less evidenced in the case of spruce sawdust (Fig. 4E and 4F) probably  
356 due to a distinct chemical composition of the lignocellulosic matrix. Constitutive  
357 hemicelluloses from oak sawdust were most specifically detected by the stretching  
358 band at  $1737\text{ cm}^{-1}$  mainly due to the presence of CO from the acetyl groups [51]. It is  
359 important to note that this band could be assigned in a lesser extent to CO from  
360 lignin. The intensity of this band decreased significantly after IL-pretreatment  
361 suggesting that deacetylation of hemicellulose occurred during [Emim][OAc]-  
362 pretreatment despite the low temperature of implementation. These observations  
363 were concordant with those reporting deacetylation of xylan during [Emim][OAc]-  
364 pretreatment of eucalyptus wood [21]. For spruce sawdust, this modification was also  
365 evidenced but to a lesser extent on the FTIR spectra. Likewise, a slight delignification  
366 could occur during pretreatment explaining partially this decrease. Concerning lignin,  
367 the characteristic spectral fingerprinting in the range of  $1512\text{ cm}^{-1}$  to  $1328\text{ cm}^{-1}$   
368 (aromatic skeletal vibrations of lignin and syringyl and guaiacyl condensed lignin) [52]  
369 was still present for both IL-pretreated spruce and oak sawdusts. These results  
370 confirmed that a major part of lignin was still present in the solid fraction after  
371 [Emim][OAc]-pretreatment, as demonstrated in previous work with IL-pretreatment at  
372 higher temperature [16].

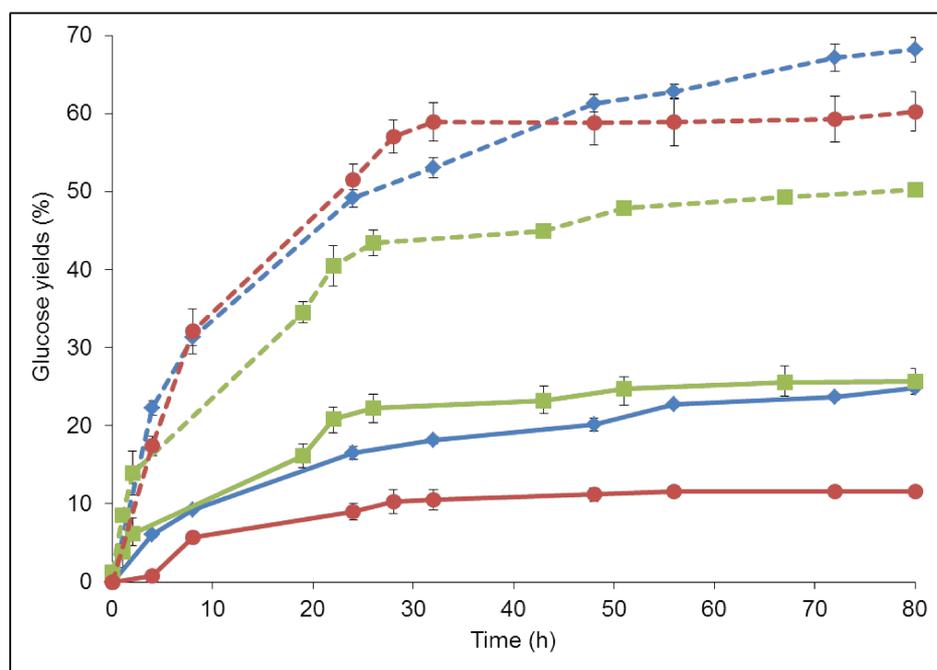
373 In summary, [Emim][OAc]-pretreatment of softwood and hardwood sawdust at  
374 low temperature may induce some chemical and structural changes without

375 significant fractioning. Despite the low temperature of implementation, IL-  
376 pretreatment would allow partial deacetylation of hemicellulose and affect sufficiently  
377 supramolecular structure of cellulose to improve its enzymatic saccharification while  
378 minimizing the energy demand.

379

### 380 3.6 Enzymatic hydrolysis of LCBs

381 The three substrates were then enzymatically hydrolyzed by cellulases from *T.*  
382 *reesei* before and after the [Emim][OAc]-pretreatment at 45 °C (Fig. 5). It is worth  
383 remembering that cellulose contents were different in spruce and oak sawdusts  
384 (55.4% and 44.7%, respectively). In order to compare the three (ligno)cellulosic  
385 substrates, the glucose production by enzymatic hydrolysis are presented in Fig. 5 as  
386 percentages of the cellulosic fraction in the biomasses.



387

388 **Fig. 5.** Glucose yields during enzymatic hydrolysis by cellulases of *T. reesei* of long  
389 fiber cellulose (◆), spruce sawdust (■) and oak sawdust (●), before (full lines) and  
390 after (dashed lines) [Emim][OAc] pretreatment at 45 °C during 40 min.

391

392 The enzymatic hydrolysis of the untreated substrates by cellulases from *T.*  
393 *reesei* gave glucose yields at 80 h of 24.9% for long fiber cellulose, 25.5% for spruce  
394 sawdust and 11.6% for oak sawdust, respectively. Thus, without pretreatment, the  
395 cellulolytic enzymes had an even more difficult access to cellulose fibers in  
396 hardwood, compared to softwood and model cellulose. After [Emim][OAc]

397 pretreatment at 45 °C, the glucose yields were significantly improved whatever was  
398 the substrate. At 80 h of enzymatic hydrolysis, 68.2% of the long fiber cellulose was  
399 converted into glucose, 49.3% for spruce sawdust and 59.3% for oak sawdust. Thus  
400 [Emim][OAc] pretreatment largely increased the accessibility surface area for the  
401 hydrolytic enzymes and therefore greatly improved the glucose yields even at low  
402 temperature. The model cellulose hydrolysis was increased by a factor 2.7 after the  
403 IL-pretreatment, the spruce sawdust by a factor 1.9 and the oak sawdust by a factor  
404 5.1, respectively at 80h. The low residual [Emim][OAc] remaining entrapped into the  
405 pretreated biomasses did not exhibit major deactivating effect on hydrolytic enzymes  
406 as compared to the beneficial effect of increasing the enzyme accessibility to the  
407 disorganized substrates [33] and did not generate a significant increase in the buffer  
408 viscosity neither (see supplementary data 2). Hardwood (oak) which was the more  
409 recalcitrant before pretreatment led to the highest factor increase after IL-  
410 pretreatment, confirming the SEM observations and the wider accessible surface to  
411 the cellulases (Fig. 3). Whereas softwood (spruce) showed the lowest increase,  
412 indicating that the nature and the architecture of the wood directly influenced the  
413 cellulose enzymatic hydrolysis [20]. More, the structure of the lignin polymer itself  
414 and its distribution inside the fiber is varying depending on the wood species and  
415 could prevent the accessibility of the cellulases to the cellulose fibrils into the  
416 softwood [1].

417 When comparing our results to the literature, the [Emim][OAc] pretreatment at  
418 45 °C gave lower glucose yields than at classical higher temperatures. The maximum  
419 glucose yields after cellulase hydrolysis on long fiber cellulose pretreated with  
420 [Emim][OAc] at 110 °C was equal to 74.6% at 72 h [14] whereas we found 67.2% at  
421 45 °C and for spruce sawdust and oak sawdust equal to 73.3% and 79.1% at 72 h,  
422 respectively [16], whereas we found 49.3% and 59.3% at 45 °C, respectively.  
423 Therefore, the low pretreatment temperature diminished more the efficiency of the  
424 enzymatic hydrolysis when applied to raw LCB matrices compared to pure cellulose.  
425 The temperature should then be adjusted and optimized in future works in order to  
426 obtain a good compromise between the high glucosic yields after enzymatic  
427 hydrolysis and the low energetic cost of the process.

428

### 429 *3.7 Fermentation of the enzymatic hydrolysates of LCBs*

430 The glucose units released by the enzymatic hydrolysis of the substrates

431 catalyzed by cellulases were then fermented by the yeast *S. cerevisiae* after  
432 sterilization and addition of the YM culture medium components (yeast extract, malt  
433 extract and peptone). The only ethanologenic molecules in the growth medium are  
434 issued from the enzymatic hydrolysis of the LCBs [37].

435 The glucose concentrations at the beginning of the yeast cultures were  
436 measured (Table 2).

437

438 **Table 2.** Initial glucose concentration (g/L) in the *S. cerevisiae* growth medium after  
439 addition of YM components.

Initial glucose concentration (g/L)	Cellulose	Spruce sawdust	Oak sawdust
Untreated	5.2 ± 0.1	2.4 ± 0.4	1.2 ± 0.1
[Emim][OAc]-pretreated	15.2 ± 0.0	6.8 ± 0.5	6.1 ± 0.3

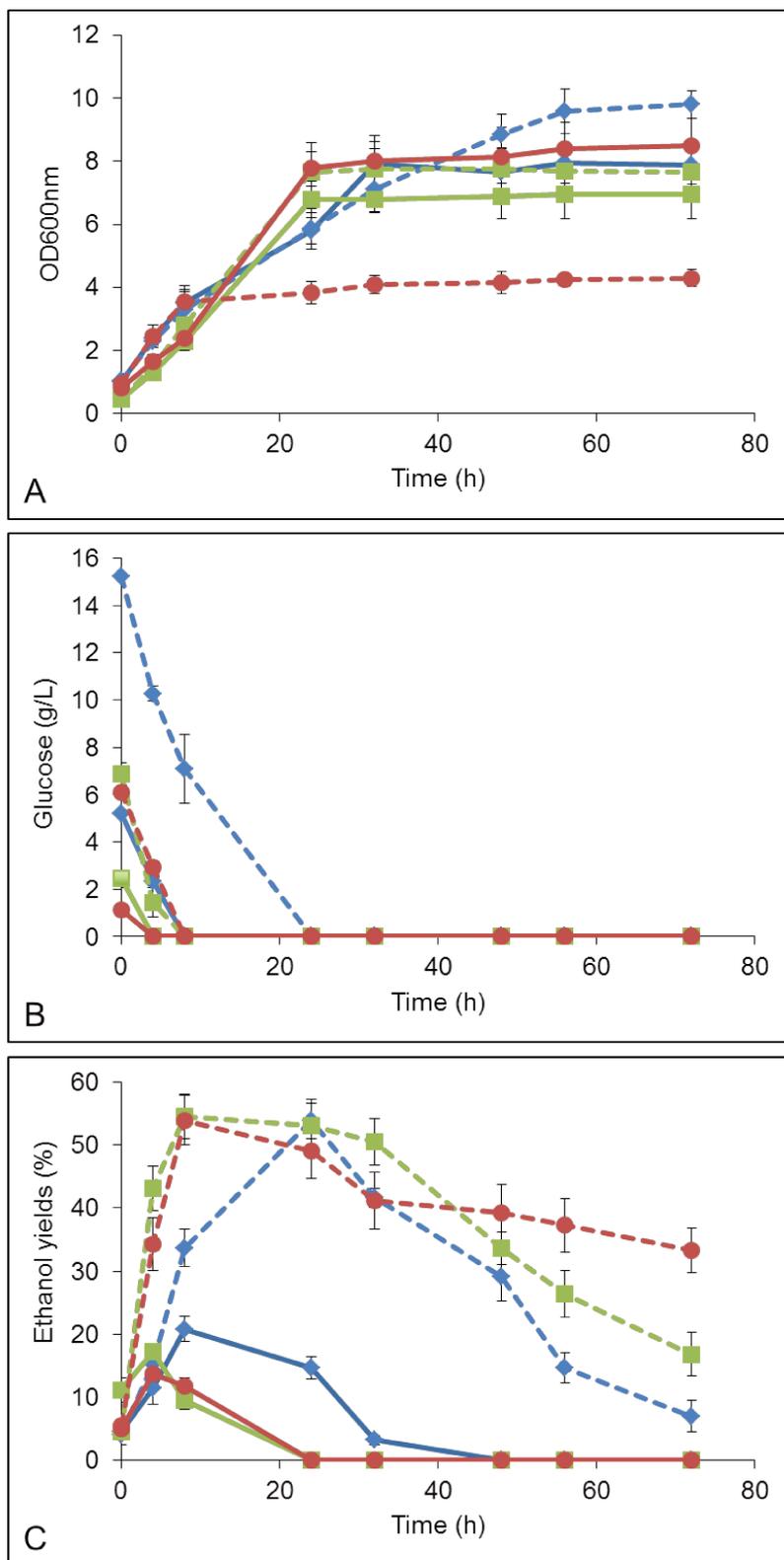
440

441

442 The initial glucose concentrations in the growth medium were linked to the  
443 glucose yields already mentioned in Fig. 5, but here they are expressed in term of  
444 glucose concentration in g/L. The highest glucose concentration was obtained for the  
445 [Emim][OAc]-pretreated long fiber cellulose (15.2 g/L) and the lowest for the  
446 untreated oak sawdust (1.2 g/L) which had the smallest cellulose content of the three  
447 substrates.

448 The inoculation of *S. cerevisiae* yeast in the growth media containing enzymatic  
449 hydrolysates marked the initial time of the culture. The yeast culture was assayed by  
450 following several parameters: the cell growth by measuring the Optical Density at 600  
451 nm ( $OD_{600nm}$ ) (Fig. 6A), the glucose consumption (Fig. 6B) and the ethanol synthesis  
452 by HPLC (Fig. 6C). It should be noted that the low residual IL concentration still  
453 remaining in the growth medium from the pretreatment step did not significantly  
454 increased the viscosity of the yeast growth medium (see supplementary data 2).

455



456  
 457  
 458  
 459  
 460  
 461

**Fig. 6.** *S. cerevisiae* cultures on YM medium containing the enzymatic hydrolysates of long fiber cellulose (◆), spruce sawdust (■) and oak sawdust (●), before (full lines) and after (dashed lines) [Emim][OAc] pretreatment at 45 °C during 40 min. Growth (OD<sub>600nm</sub>) (A), glucose consumption (B) and ethanol synthesis (C).

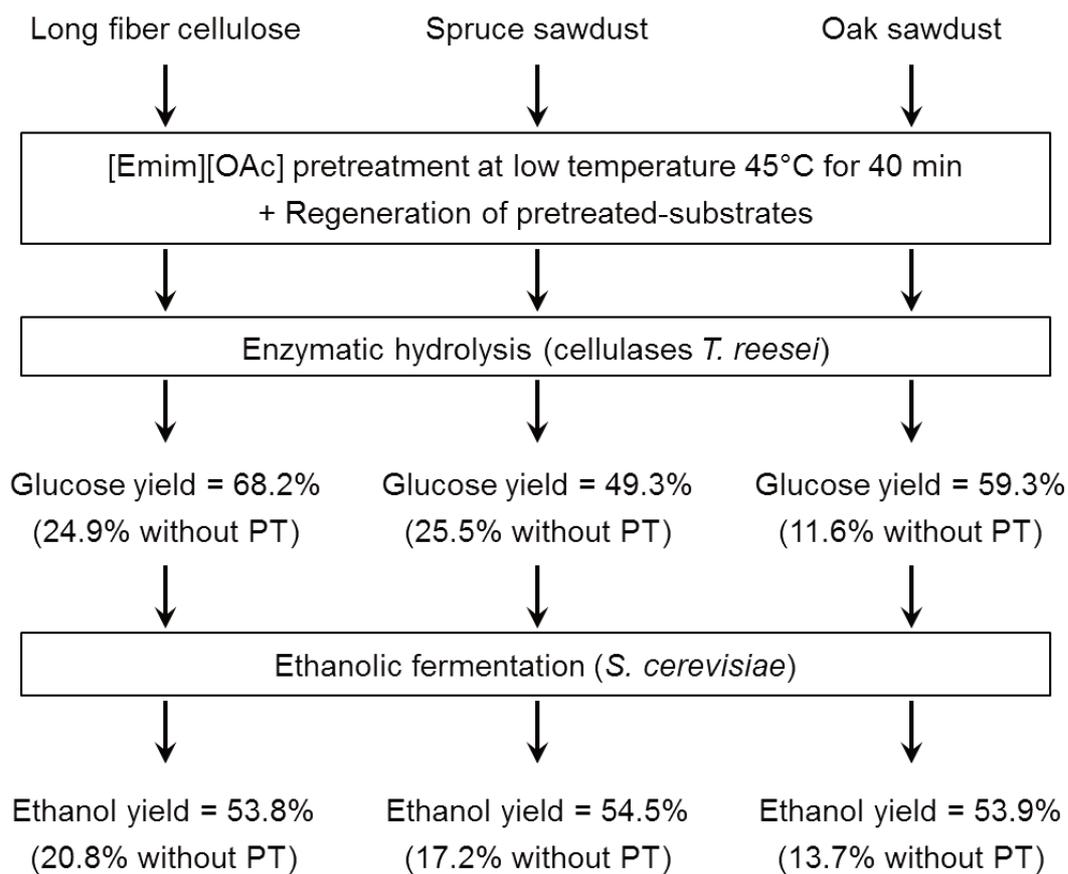
462 All the yeast growths on the enzymatic hydrolysates of the three substrates  
463 untreated and [Emim][OAc]-pretreated showed a classical kinetic with exponential  
464 growth phase and stationary phase (Fig. 6A). For cellulose, the OD<sub>600nm</sub> value in  
465 stationary phase was higher after [Emim][OAc]-pretreatment (9.8) than for untreated  
466 substrate (7.6). The same observation could be done on spruce sawdust: the  
467 maximum OD<sub>600nm</sub> was equal to 7.7 for the pretreated substrate and 6.9 for the  
468 untreated one. But for oak sawdust, the maximum OD<sub>600nm</sub> was lower for the  
469 [Emim][OAc]-pretreated sawdust (4.3) than for untreated substrate (8.5). As a  
470 consequence, the residual IL entrapped in the regenerated biomasses was not  
471 deleterious for yeasts when the substrates were cellulose and spruce sawdusts. In  
472 addition, the yeast growths were higher in pretreated-substrates because of the  
473 higher initial glucose concentrations. But on oak sawdust specifically, the cell growth  
474 was lower on pretreated-substrate even if the initial glucose concentration was  
475 almost 5 times higher (6.1 g/L with pretreatment vs 1.2 g/L without pretreatment, see  
476 Table 2), meaning that a substance liberated by the enzymatic hydrolysis of  
477 [Emim][OAc]-pretreated oak could limit the *S. cerevisiae* growth, probably tannins  
478 released from oak, well known for their antimicrobial properties [53].

479 All the glucose units liberated by enzymatic hydrolysis were totally consumed by  
480 the yeast in all the experimental conditions in less than 8 h, except on [Emim][OAc]-  
481 pretreated cellulose which had the higher initial glucose concentration which was  
482 totally consumed in 24 h (Fig. 6B).

483 The ethanol concentration was then followed during the yeast culture, the  
484 results in Fig. 6C are expressed in ethanolic yields, *i.e.* reported on the initial glucose  
485 concentration. In all conditions, *S. cerevisiae* produced ethanol when glucose was  
486 remaining in the growth medium. As soon as the glucose is completely consumed,  
487 the yeasts consumed in turn the ethanol which concentration then decreased,  
488 according to literature [37,39]. The maximal ethanol concentrations were thus  
489 observed at around 8 h for all the conditions, except for the pretreated cellulose  
490 which was the highest at 24 h, and then diminished. The highest ethanol yields were  
491 almost identical for all the three [Emim][OAc]-pretreated biomasses: 53.8% for the  
492 long fiber cellulose, 54.5% for spruce sawdust and 53.9% for oak sawdust (Fig. 6C).  
493 These ethanolic yields were significantly increased compared to the same substrates  
494 without previous IL-pretreatment: 20.8% for the model cellulose, 17.2% for the  
495 spruce sawdust and 13.7% for the oak sawdust, respectively.

496 Thus, in spite of different yeast growths depending on the experimental  
 497 condition (Fig. 6A), the maximum ethanol yields were similar regardless of the LCB  
 498 substrate used and were significantly higher after the [Emim][OAc]-pretreatment at  
 499 45 °C: 2.6 times for cellulose, 2.8 times for spruce sawdust and 3.9 times for oak,  
 500 respectively. Previous works already showed a very high ethanol yields whereas the  
 501 yeast growth was low [37,39]. No major inhibition in ethanolic fermentation was  
 502 evidenced neither by the residual [Emim][OAc] IL remaining entrapped in the  
 503 pretreated substrate, nor by the other components of the wood substrates lignin,  
 504 hemicellulose, or extractives, or by a co-product derived from the IL pretreatment or  
 505 by the enzymatic hydrolysis, which had been shown previously in some reports to  
 506 affect yeast fermentation [36,38].

507 The main steps of the process and the principal results are summarized in Fig.  
 508 7.



509  
 510 **Fig. 7.** Main steps of the process: the LCB pretreatment with [Emim][OAc] at low  
 511 temperature, the enzymatic hydrolysis (with the glucose yields) and the ethanolic  
 512 fermentation (with the ethanolic yields).

513

514 In order to make this low temperature process sustainable and cost-friendly, an  
515 efficient recycling and reuse of the IL is a major concern, *i.e.* a recycling that allows a  
516 complete recover of the pretreated substrates, without impurities, while maintaining  
517 the same efficiency in the subsequent pretreatments [8,34,48]. Previous works on  
518 long fiber cellulose, spruce sawdust and oak sawdust pretreated with [Emim][OAc] at  
519 110 °C showed that the IL could be recycled and reused until 7 times without  
520 significant lost of efficiency, nor alteration of the IL molecular structure [14,16]. Future  
521 work on recycling of the IL after low temperature pretreatment should be envisaged,  
522 as well as a thorough optimization of the different parameters of each step of the  
523 process.

524

#### 525 **4. Conclusion**

526 Our results highlighted that [Emim][OAc] pretreatment was efficient even at low  
527 temperature (45 °C) either on model cellulose, or on industrial woody LCBs. The  
528 ethanolic yields were significantly increased after [Emim][OAc]-pretreatment,  
529 respectively by a factor 2.6 for the model cellulose, 2.8 for the spruce sawdust and  
530 3.9 for the oak sawdust.

531 This encouraging work is a preliminary approach which could lead to a one-pot  
532 process, from LCB to bioethanol, regrouping the 3 steps of the process: IL-  
533 pretreatment (here at 45 °C), enzymatic hydrolysis (here at 40 °C) and microbial  
534 fermentation (here at 30 °C).

535 The possibility to implement efficient IL-pretreatment at low temperature  
536 strengthens the promise of these solvents for sustainable and energy-saving  
537 biorefinery process.

538

#### 539 **Aknowledgements**

540 This work was supported by the Conseil Régional Hauts de France, the  
541 European Fund of Regional Development (NM) and the association AZM & Saade  
542 (RA). We are very grateful to Frederic Nadaud from the Platform of Electron  
543 Microscopy of the University of Technology Compiègne, France, for SEM analysis.

544

#### 545 **References**

546 [1] H. Tadesse, R. Luque, Advances on biomass pretreatment using ionic liquids:  
547 An overview, Energy Environ. Sci. 4 (2011) 3913. doi: 10.1039/c0ee00667j

548

549 [2] S. Liu, H. Lu, R. Hu, A. Shupe, L. Lin, B. Liang, A sustainable woody biomass  
550 biorefinery, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 785-810.  
551 doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.013

552

553 [3] A. Brandt, J. Gräsvik, J.P. Hallett, T. Welton, Deconstruction of lignocellulosic  
554 biomass with ionic liquids, *Green Chem.* 15 (2013) 550. doi:  
555 10.1039/c2gc36364j

556

557 [4] H. Zabed, J.N. Sahu, A.N. Boyce, G. Faruq, Fuel ethanol production from  
558 lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological  
559 approaches, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 66 (2016) 751-774.  
560 doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038

561

562 [5] M. Balat, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the  
563 biochemical pathway: a review, *Energ. Convers. Manag.* 52 (2011) 858. doi:  
564 10.1016/j.enconman.2010.08.013

565

566 [6] A. Limayem, S.C.Ricke, Lignocellulosic biomass for bioethanol production:  
567 Current perspectives, potential issues and future prospects, *Prog. Energy*  
568 *Combust. Sci.* 38 (2012) 449-467. doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002

569

570 [7] A. Stark, Ionic liquids in the biorefinery: a critical assessment of their potential,  
571 *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 19-32. doi: 10.1039/c0ee00246a

572

573 [8] K.C. Badgujar, B.M. Bhanage, Factors governing dissolution process of  
574 lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges,  
575 *Bioresour. Technol.* 178 (2015) 2-18. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.138

576

577 [9] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro, Pretreatment technologies  
578 for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a  
579 review, *Bioresour Technol.* 101 (2010) 4851. doi:  
580 10.1016/j.biortech.2009.11.093

581

- 582 [10] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, D. Morvan, Ionic liquids and catalysis: recent  
583 progress from knowledge to applications, *Appl Catal A*. 373 (2010) 1.  
584 doi.org/10.1016/j.apcata.2009.10.008  
585
- 586 [11] H. Rabemanolontsoa, S. Saka, Various pretreatments of lignocellulosics,  
587 *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 83-91. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029  
588
- 589 [12] G. Quijano, A. Couvert, A. Amrane, G. Darracq, C. Couriol, P. Le Cloirec, L.  
590 Paquin, D. Carrié, Toxicity and biodegradability of ionic liquids: New  
591 perspectives towards whole-cell biotechnological applications, *Chem. Eng. J.*  
592 174 (2011) 27-32. doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.055  
593
- 594 [13] E. Husson, S. Buchoux, C. Avondo, D. Cailleu, K. Djellab, I. Gosselin, O.  
595 Wattraint, C. Sarazin, Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses:  
596 Contribution of CP-MAS <sup>13</sup>C NMR and SEM, *Bioresour. Technol.* 102 (2011)  
597 7335-7342. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.097  
598
- 599 [14] T. Auxenfans, S. Buchoux, K. Djellab, C. Avondo, E. Husson, C. Sarazin, Mild  
600 pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic  
601 liquids towards one-batch process, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 805-813.  
602 doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.101  
603
- 604 [15] T. Vancov, A.-S. Alston, T. Brown, S. McIntosh, Use of ionic liquids in  
605 converting lignocellulosic material to biofuels, *Renew. Energy* 45 (2012) 1-6.  
606 doi.org/10.1016/j.renene.2012.02.033  
607
- 608 [16] T. Auxenfans, S. Buchoux, D. Larcher, G. Husson, E. Husson, C. Sarazin,  
609 Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust:  
610 Recycled ionic liquids pretreatments, *Energy Convers. Manag.* 88 (2014) 1094-  
611 1103. doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.027  
612
- 613 [17] Y. Cao, R. Zhang, T. Cheng, J. Guo, M. Xian, H. Liu, Imidazolium-based ionic  
614 liquids for cellulose pretreatment: recent progresses and future perspectives,  
615 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 521-532.

- 616 doi.org/10.1007/s00253.016.8057.8  
617
- 618 [18] Q. Zhang, J. Hu, D.-J. Lee, Pretreatment of biomass using ionic liquids:  
619 Research updates, *Renew. Energy* 111 (2017) 77-84.  
620 doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.093  
621
- 622 [19] P. Mäki-Arvela, I. Anugwom, P. Virtanen, R. Sjöholm, J.P. Mikkola, Dissolution  
623 of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids - A review,  
624 *Ind. Crop. Prod.* 32 (2010) 175-201. doi:10.1016/j.indcrop.2010.04.005  
625
- 626 [20] N. Sun, M. Rahman, Y. Qin, M.L. Maxim, H. Rodríguez, R.D. Rogers, Complete  
627 dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-  
628 methylimidazolium acetate, *Green Chem.* 11 (2009) 646-655. doi:  
629 10.1039/b822702k  
630
- 631 [21] Ö.P. Çetinkol, D.C. Dibble, G. Cheng, M.S. Kent, B. Knierim, M. Auer, D.E.  
632 Wemmer, J.G. Pelton, Y.B. Melnichenko, J. Ralph, B.A. Simmons, B.M.  
633 Holmes, Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on eucalyptus.  
634 *Biofuels* 1 (2010) 33-46. doi.org/10.4155/bfs.09.5  
635
- 636 [22] T. Auxenfans, S. Buchoux, E. Husson, C. Sarazin, Efficient enzymatic  
637 saccharification of *Miscanthus*: energy-saving by combining dilute acid and ionic  
638 liquid pretreatments, *Biomass Bioenergy* 62 (2014) 82-92.  
639 doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.011  
640
- 641 [23] H. Kim, Y. Ahn, S.-Y. Kwak, Comparing the influence of acetate and chloride  
642 anions on the structure of ionic liquid pretreated lignocellulosic biomass,  
643 *Biomass Bioenergy* 93 (2016) 243e253.  
644 doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.022  
645
- 646 [24] E. Husson, T. Auxenfans, M. Herbaut, M. Baralle, V. Lambertyn, H.  
647 Rakotoarivonina, C. Rémond, C. Sarazin, Sequential and simultaneous  
648 strategies for biorefining of wheat straw using room temperature ionic liquids,  
649 xylanases and cellulases, *Bioresour. Technol.* 251 (2018) 280-287.

650 doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.047  
651  
652 [25] Y. Wang, M. Radosevich, D. Hayes, N. Labbé, Compatible ionic liquid-  
653 cellulases system for hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biotechnol. Bioeng.*  
654 108 (2011) 1042-1048. doi: 10.1002/bit.23045  
655  
656 [26] N. Labbé, L.M. Kline, L. Moens, K. Kim, P.C. Kim, D.G. Hayes, Activation of  
657 lignocellulosic biomass by ionic liquid for biorefinery fractionation, *Bioresour.*  
658 *Technol.* 104 (2012) 701-707. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.062  
659  
660 [27] J. Zhang, Y. Wang, L. Zhang, R. Zhang, G. Liu, G. Cheng, Understanding  
661 changes in cellulose crystalline structure of lignocellulosic biomass during ionic  
662 liquid pretreatment by XRD, *Bioresour. Technol.* 151 (2014) 402-405.  
663 doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.009  
664  
665 [28] R. Parthasarathi, J. Sun, T. Dutta, N. Sun, S. Pattathil, N.M. Konda, *et al.*  
666 Activation of lignocellulosic biomass for higher sugar yields using aqueous ionic  
667 liquid at low severity process conditions, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016) 160.  
668 <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0561-7>  
669  
670 [29] P. Moyer, K. Kim, N. Abdoulmoumine, S.C. Chmely, B.K. Long, D.J. Carrier, N.  
671 Labbé, Structural changes in lignocellulosic biomass during activation with ionic  
672 liquids comprising 3-methylimidazolium cations and carboxylate anions,  
673 *Biotechnol. Biofuels.* 11 (2018) 265. doi: 10.1186/s13068-018-1263-0  
674  
675 [30] Y. Fukaya, K. Hayashi, M. Wada, H. Ohno, Cellulose dissolution with polar  
676 ionic liquids under mild conditions: required factors for anions, *Green Chem.* 10  
677 (2008) 44-46. doi: 10.1039/b713289a  
678  
679 [31] C. Scullin, A.G. Cruz, Y.-D. Chuang, B.A. Simmons, D. Loque, S. Singh,  
680 Restricting lignin and enhancing sugar deposition in secondary cell walls  
681 enhances monomeric sugar release after low temperature ionic liquid  
682 pretreatment, *Biotechnol. Biofuels* 8 (2015) 95. doi.org/10.1186/s13068-015-  
683 0275-2

- 684
- 685 [32] S.V. Farahani, Y.-W. Kim, C.A. Schall, A coupled low temperature oxidative  
686 and ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass, *Catal. Today* 269 (2016)  
687 2-8. doi.org/10.1016/j.cattod.2015.12.022
- 688
- 689 [33] T. Auxenfans, E. Husson, C. Sarazin, Simultaneous pretreatment and  
690 enzymatic saccharification of (ligno) celluloses in aqueous-ionic liquid media: A  
691 compromise, *Biochem. Eng. J.* 117 (2017) 77-86.  
692 doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.004
- 693
- 694 [34] Q. Hou, M. Ju, W. Li, L. Liu, Y. Chen, Q. Yang, Pretreatment of lignocellulosic  
695 biomass with ionic liquids and ionic liquid-based solvent systems, *Molecules* 22  
696 (2017) 490. doi: 10.3390/molecules22030490
- 697
- 698 [35] Z. Liu, L. Li, C. Liu, A. Xu, Saccharification of cellulose in the ionic liquids and  
699 glucose recovery, *Renew. Energy* 106 (2017) 99-102.  
700 doi.org/10.1016/j.renene.2017.01.023
- 701
- 702 [36] I.R. Sitepu, S. Shi, B.A. Simmons, S.W. Singer, K. Boundy-Mills, C.W.  
703 Simmons, Yeast tolerance to the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium  
704 acetate, *FEMS Yeast Res.* 14 (2014) 1286-1294. doi: 10.1111/1567-  
705 1364.12224
- 706
- 707 [37] N. Mehmood, E. Husson, C. Jacquard, S. Wewetzer, J. Büchs, C. Sarazin, I.  
708 Gosselin, Impact of two ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and  
709 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate, on *Saccharomyces*  
710 *cerevisiae*: metabolic, physiologic, and morphological investigations, *Biotechnol.*  
711 *Biofuels* 8 (2015) 17. doi.org/10.1186/s13068.015.0206.2
- 712
- 713 [38] Q. Dickinson, S. Bottoms, L. Hinchman, S. McIlwain, S. Li, C.L. Myers, C.  
714 Boone, J.J. Coon, A. Hebert, T.K. Sato, R. Landick, J. Piotrowski, Mechanism of  
715 imidazolium ionic liquids toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and rational  
716 engineering of a tolerant, xylose-fermenting strain, *Microb. Cell Factories* 15  
717 (2016) 17. doi.org/10.1186/s12934.016.0417.7

- 718
- 719 [39] N. Mehmood, R. Alayoubi, E. Husson, C. Jacquard, J. Büchs, C. Sarazin, I.  
720 Gosselin, *Kluyveromyces marxianus*, an attractive yeast for ethanolic  
721 fermentation in the presence of imidazolium ionic liquids, *Int. J. Mol. Sci.* 19  
722 (2018) 887. doi.org/10.3390/ijms19030887
- 723
- 724 [40] M. Zavrel, D. Bross, M. Funke, J. Büchs, A.C. Spiess, High-throughput  
725 screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose, *Bioresour Technol.* 100  
726 (2009) 2580-2587. doi: 10.1016/j.biortech.2008.11.052.
- 727
- 728 [41] V.K. Ponnusamy, D.D. Nguyen, J. Dharmaraja, S. Shobana, J.R. Banu, R.G.  
729 Saratale, S.W. Chang, G. Kumar, A review on lignin structure, pretreatments,  
730 fermentation reactions and biorefinery potential, *Bioresour Technol.* 271 (2019)  
731 462-472. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.070.
- 732
- 733 [42] O. Ajao, J. Jeaidi, M. Benali, A.M. Restrepo, N. El Mehdi, Y. Boumghar,  
734 Quantification and Variability Analysis of Lignin Optical Properties for Colour-  
735 Dependent Industrial Applications, *Molecules* 23 (2018) 377. doi:  
736 10.3390/molecules23020377.
- 737
- 738 [43] I. Kilpelainen, H. Xie, A. King, M. Granstrom, S. Heikkinen, D.S. Argyropoulos,  
739 Dissolution of wood in ionic liquids, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 9142-9148.  
740 doi: 10.1021/jf071692e.
- 741
- 742 [44] Z. Yang, W. Pan, Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis,  
743 *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005) 19-28.  
744 doi:10.1016/j.enzmictec.2005.02.014
- 745
- 746 [45] K. Padászyński, U. Domańska, Viscosity of Ionic Liquids: An Extensive  
747 Database and a New Group Contribution Model Based on a Feed-Forward  
748 Artificial Neural Network, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 1311-1324.  
749 dx.doi.org/10.1021/ci500206u
- 750
- 751 [46] I.P. Samayam, C.A. Schall, Saccharification of ionic liquid pretreated biomass

752 with commercial enzyme mixtures, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3561-3566.  
753 doi:10.1016/j.biortech.2009.12.066  
754

755 [47] T. Raj, R. Gaur, P. Dixit, R.P. Gupta, V. Kagdiyal, R. Kumar, D.K. Tuli, Ionic  
756 liquid pretreatment of biomass for sugars production: Driving factors with a  
757 plausible mechanism for higher enzymatic digestibility, *Carbohydr. Polym.* 149  
758 (2016) 369-381. dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.129  
759

760 [48] M. Gericke, P. Fardim, T. Heinze, Ionic Liquids - Promising but Challenging  
761 Solvents for Homogeneous Derivatization of Cellulose, *Molecules* 17 (2012)  
762 7458-7502. doi:10.3390/molecules17067458  
763

764 [49] S. Fendt, S. Padmanabhan, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, Viscosities of acetate  
765 or chloride-based ionic liquids and some of their mixtures with water or other  
766 common solvents, *J. Chem. Eng. Data* 56 (2011) 31-34. 10.1021/je1007235  
767

768 [50] Q. Zhang, S. Cai, W. Zhang, Y. Lan, X. Zhang, Density, viscosity, conductivity,  
769 refractive index and interaction study of binary mixtures of the ionic liquid 1-  
770 ethyl-3-methylimidazolium acetate with methyldiethanolamine, *J. Mol. Liq.* 233  
771 (2017) 471-478. dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.03.036  
772

773 [51] S. Naik, V.V. Goud, P.K. Rout, K. Jacobson, A.K. Dalai, Characterization of  
774 Canadian biomass for alternative renewable biofuel, *Renew. Energy*, 35 (2010)  
775 1624-1631. doi:10.1016/j.renene.2009.08.033  
776

777 [52] O. Faix, Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Lin S.Y., Dence C.W.  
778 (eds) *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Series in Wood Science. Springer,  
779 Berlin, Heidelberg (1992), pp. 83-109. doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7\_7  
780

781 [53] A. Scalbert, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry* 30 (1991)  
782 3875-3883. doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L  
783

**Table 1**

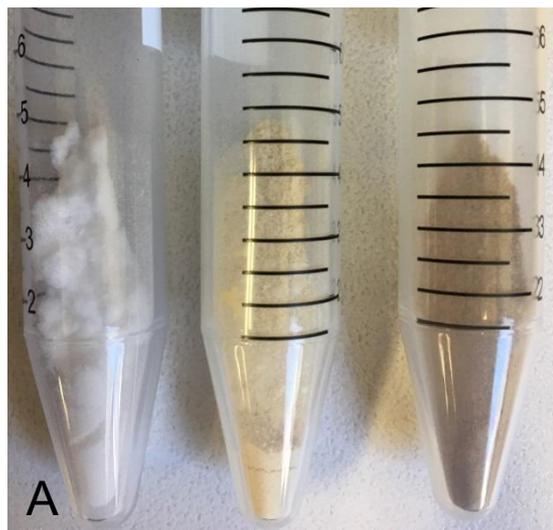
Lignocellulosic biomass	Cellulose	Lignin	Xylose	Arabinose	Extractives
Spruce sawdust	55.4 ± 1.3	28.7 ± 1.0	4.2 ± 0.4	1.4 ± 0.2	3.3 ± 1.0
Oak sawdust	44.7 ± 0.3	26.7 ± 0.8	14.8 ± 1.3	1.2 ± 0.1	4.6 ± 1.0

**Table 2**

Initial glucose concentration (g/L)	Cellulose	Spruce sawdust	Oak sawdust
Untreated	5.2 ± 0.1	2.4 ± 0.4	1.2 ± 0.1
[Emim][OAc]-pretreated	15.2 ± 0.0	6.8 ± 0.5	6.1 ± 0.3

Figure 1

Before pretreatment  
Cellulose - Spruce - Oak



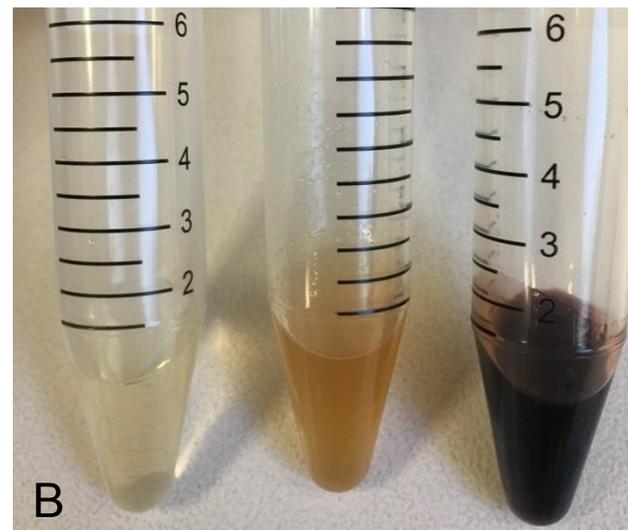
+

[Emim][OAc]  
45°C - 40 min



=

After pretreatment  
Cellulose - Spruce - Oak



**Figure 1**  
(color should be used)

Figure 2

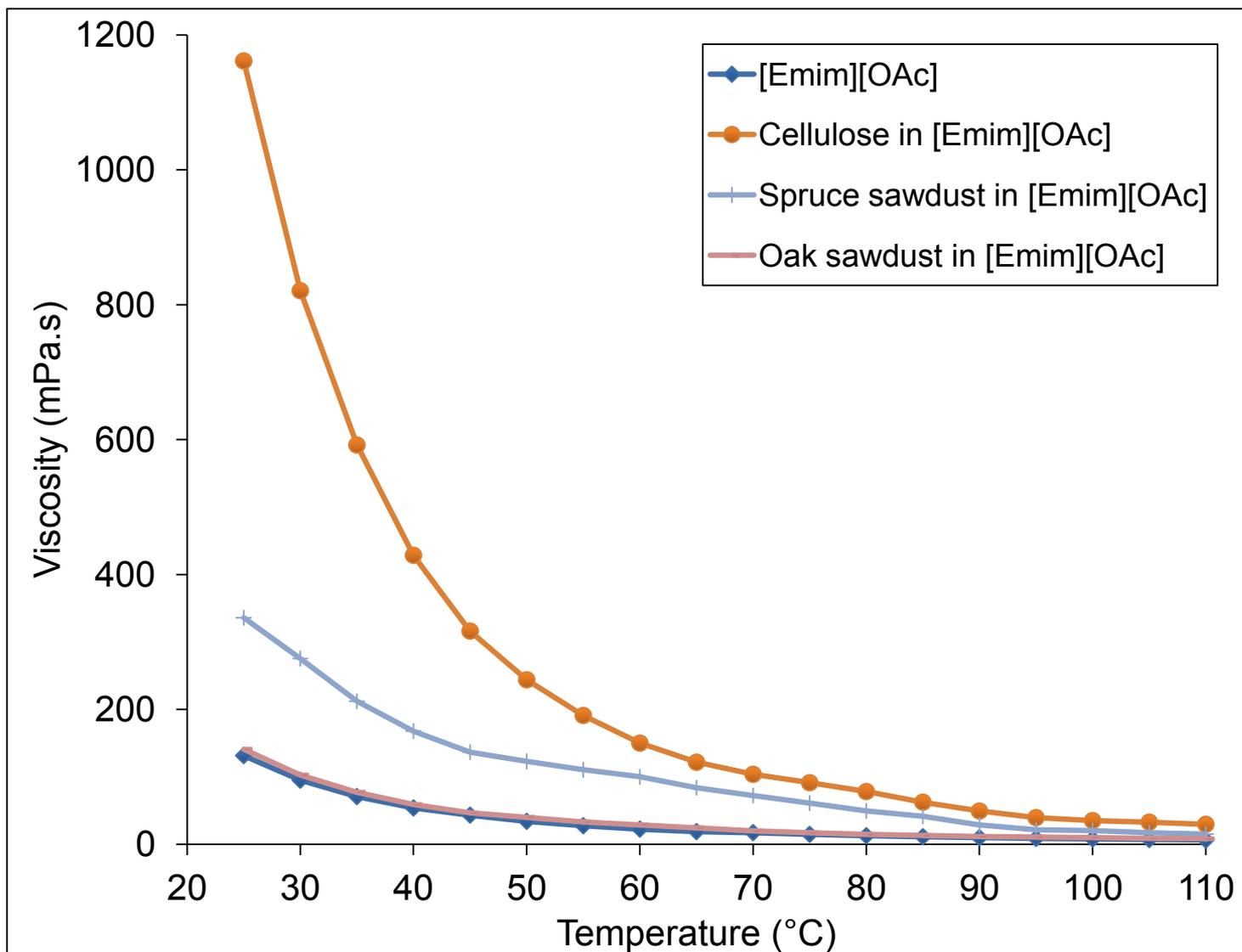
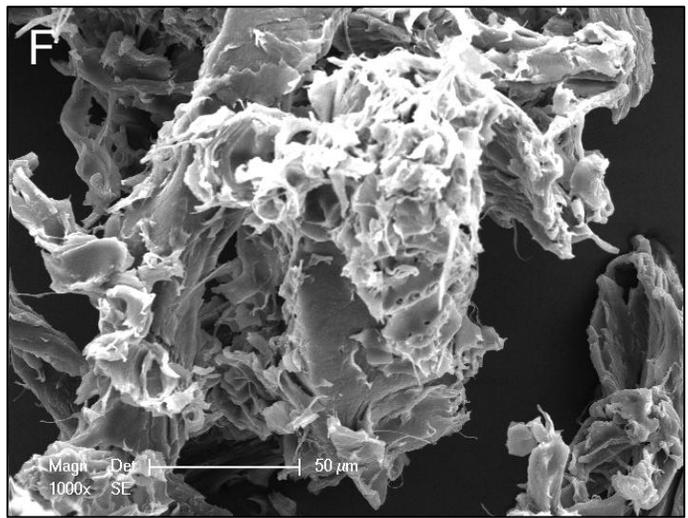
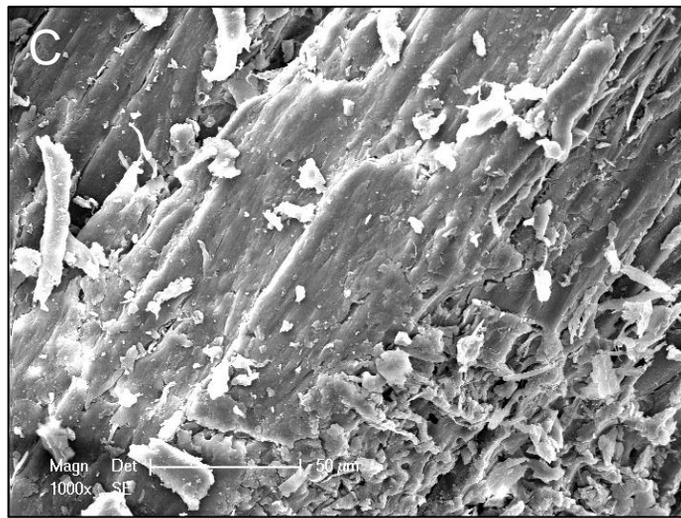
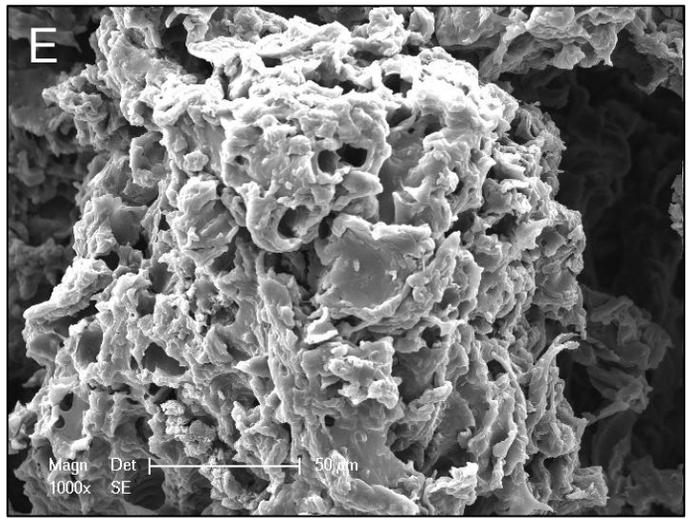
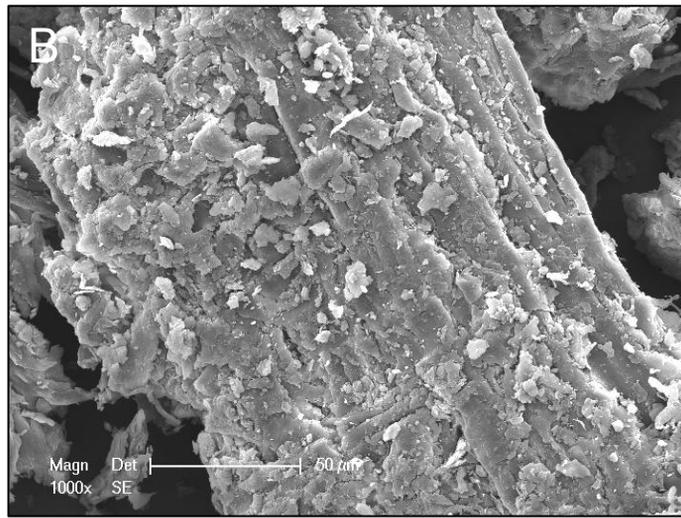
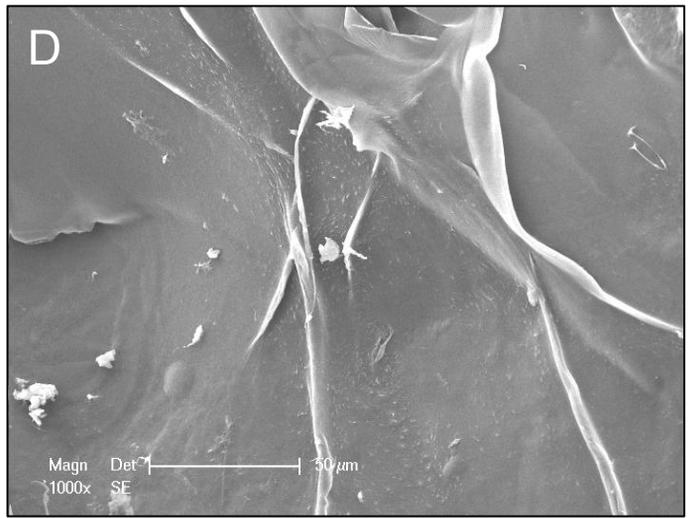
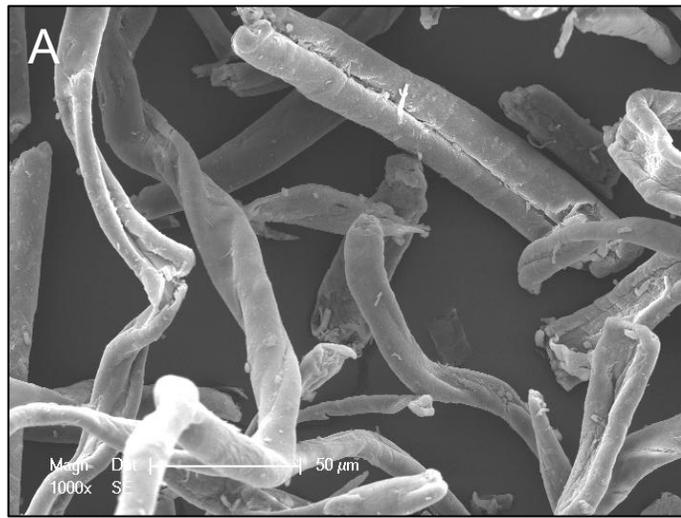


Figure 2

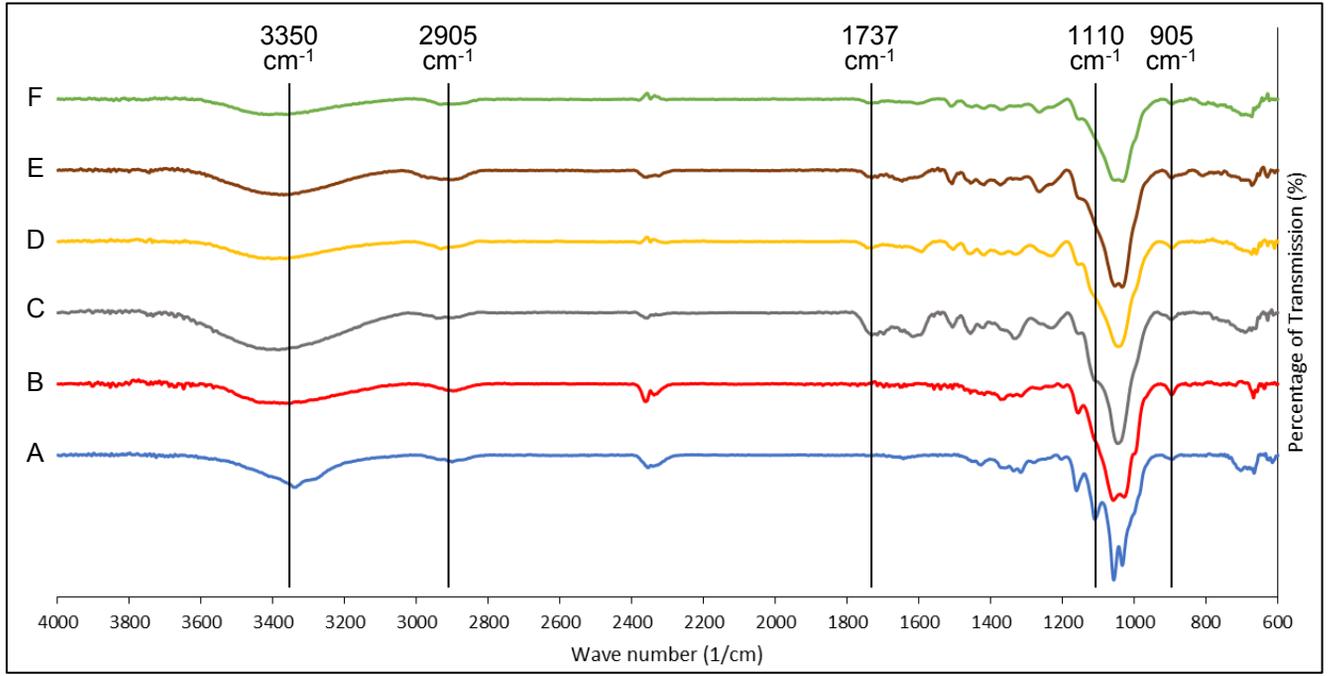
(color should be used)

**Figure 3**



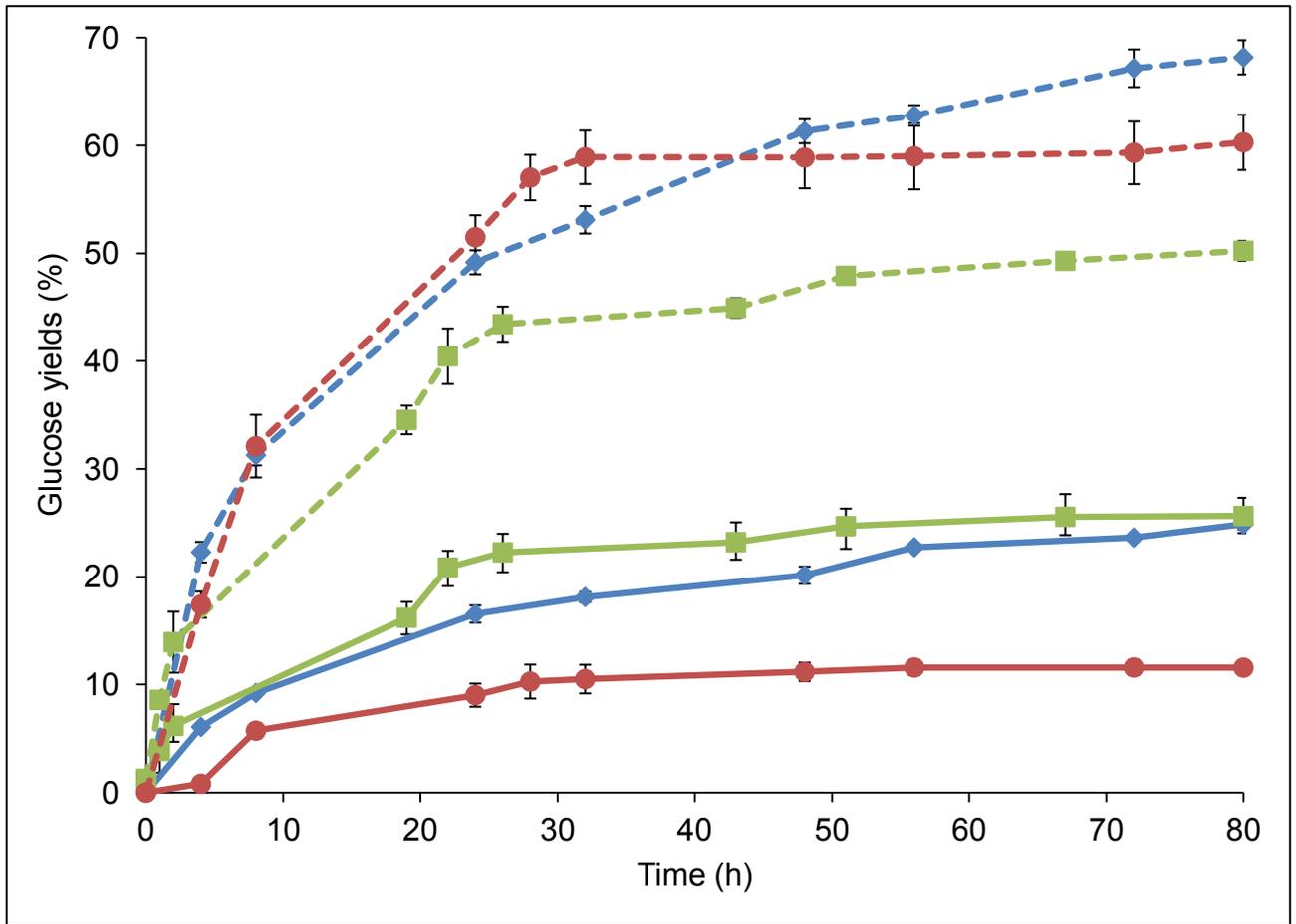
**Figure 3**

Figure 4



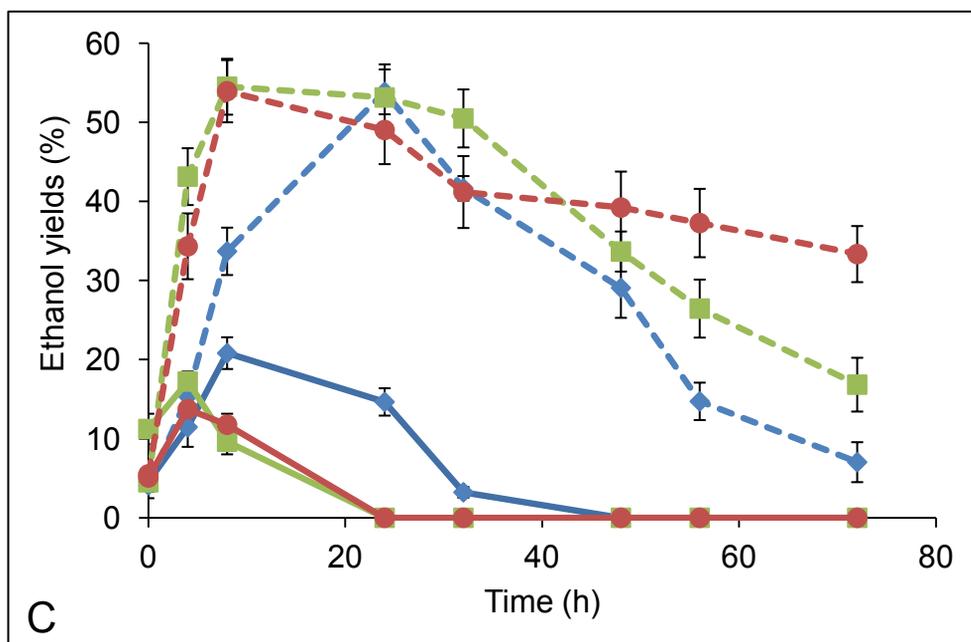
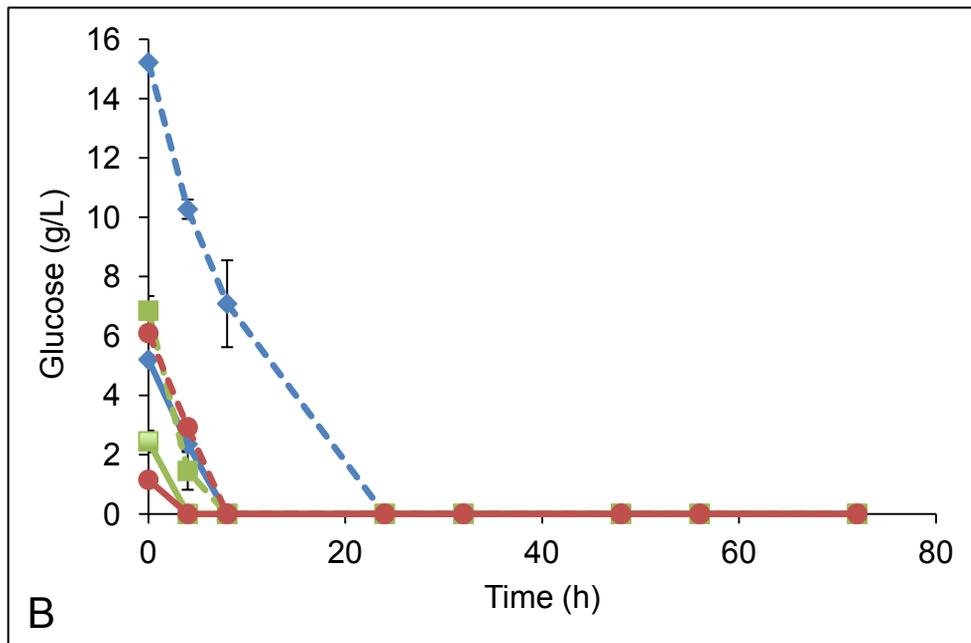
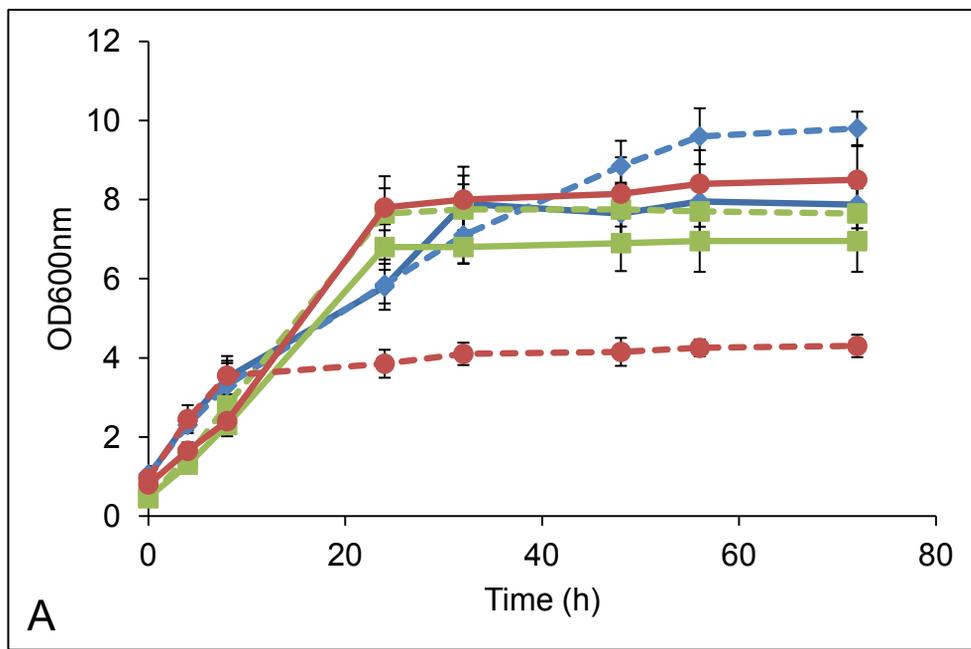
**Figure 4**  
(color should be used)

Figure 5



**Figure 5**  
(color should be used)

Figure 6



**Figure 6**  
(color should be used)

Figure 7

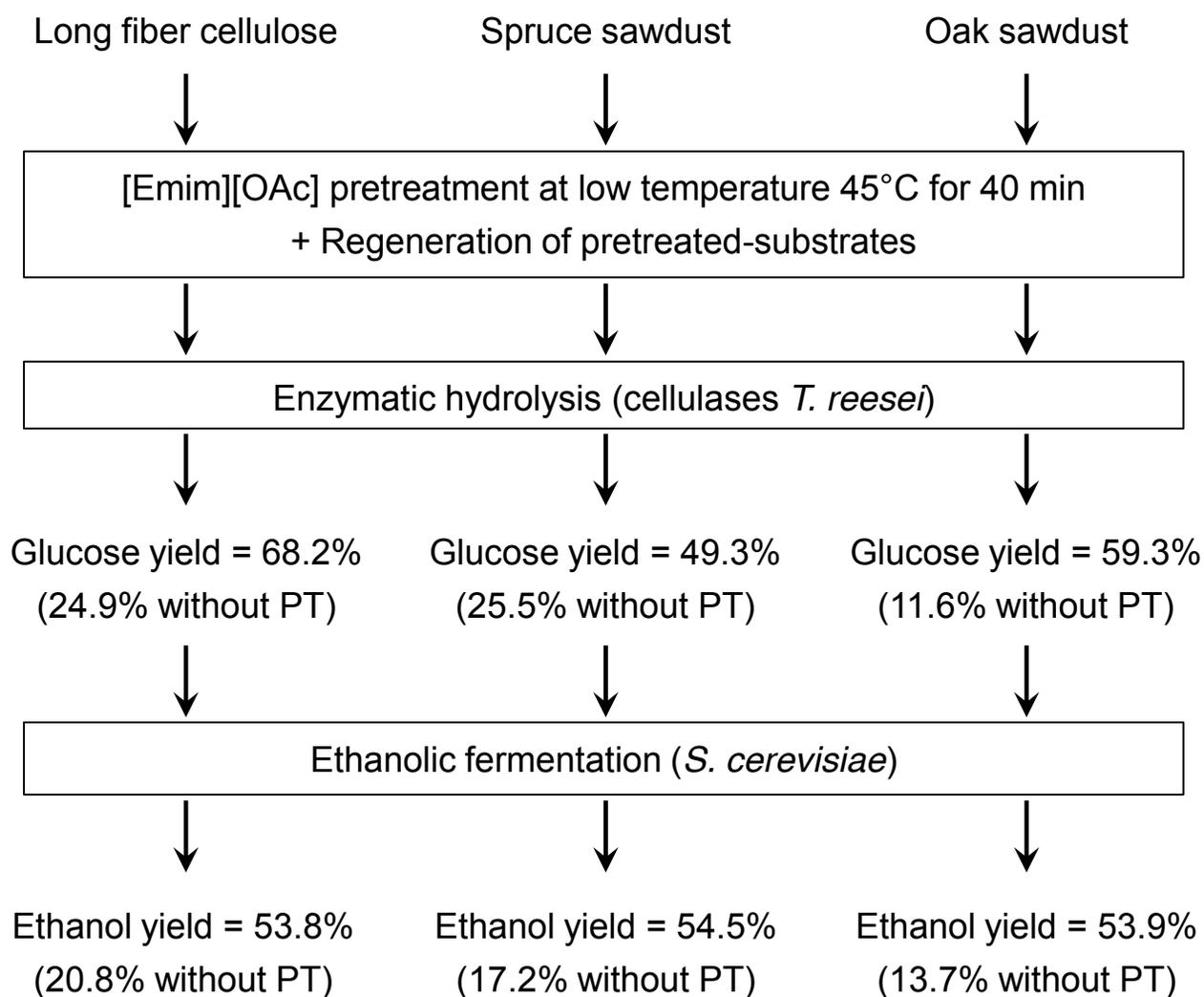
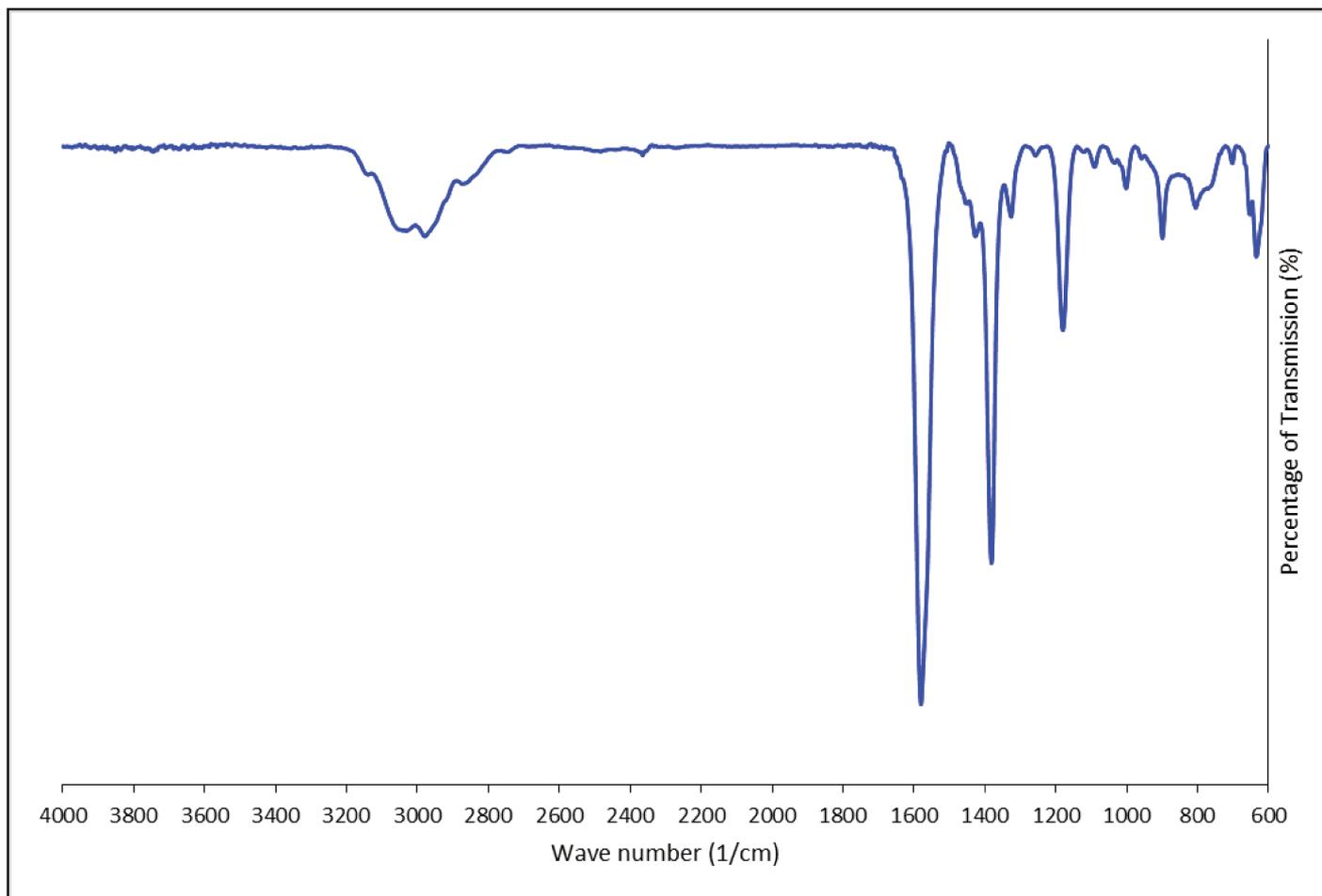
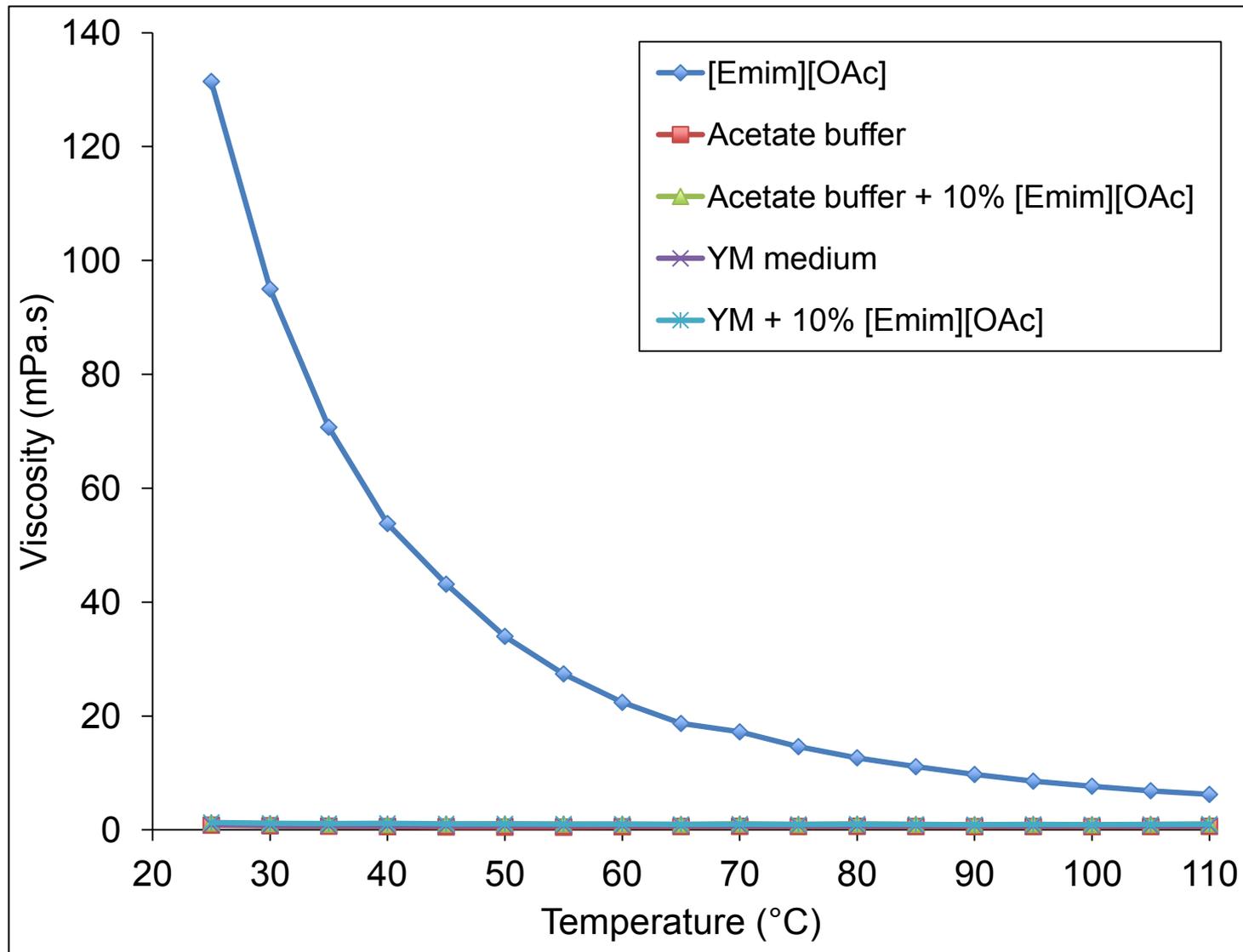


Figure 7

Supplementary data 1



FTIR spectrum of [Emim][OAc] IL



Viscosity depending on temperature of [Emim][OAc], acetate buffer +/- 10% [Emim][OAc] and YM growth medium +/- 10% [Emim][OAc]

# 1 **Straightforward Extraction and Selective Bioconversion of** 2 **High Purity Chitin from *Bombyx eri* Larva: Toward an** 3 **Integrated Insect Biorefinery**

4

5 Gael Huet,<sup>a</sup> Caroline Hadad,<sup>a</sup> Eric Husson,<sup>b</sup> Sylvain Laclef,<sup>a</sup> Virginie Lambertyn,<sup>b</sup> Monica  
6 Araya Farias,<sup>b</sup> Arash Jamali,<sup>c</sup> Matthieu Courty,<sup>d</sup> Ranim Alayoubi,<sup>b</sup> Isabelle Gosselin,<sup>b</sup>  
7 Catherine Sarazin<sup>b</sup> and Albert Nguyen Van Nhien\*<sup>a</sup>

8

9 <sup>a</sup> Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378,  
10 Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 Amiens cedex,  
11 France.

12 <sup>b</sup> Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 7025, Université de Picardie Jules Verne -  
13 UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

14 <sup>c</sup> Plateforme de Microscopie Electronique – Université de Picardie Jules Verne, HUB de l’Energie, 33  
15 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

16 <sup>d</sup> Laboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules  
17 Verne, HUB de l’Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

18 \*E-mail : [albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr](mailto:albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr)

19

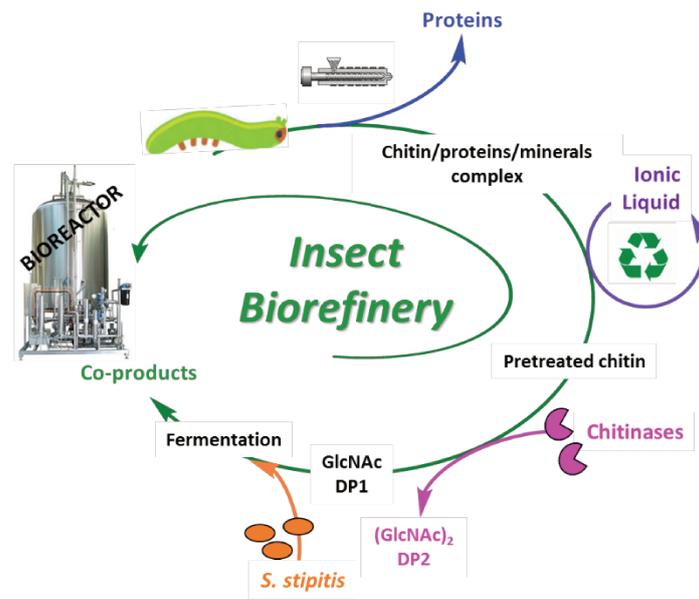
## 20 **ABSTRACT**

21

22 Chitins of different purity grades were efficiently extracted from *Bombyx eri* larva and fully physico-  
23 chemically characterized. Compared to commercially available and extracted  $\alpha$ -chitin from shrimp  
24 shell, the collected data showed that insect chitins had similar characteristics in terms of  
25 crystallographic structures, thermal stability and degree of acetylation. The major differences lay in the  
26 crystallinity indexes and in the morphological structures. Lower ash contents were also determined for  
27 the insect chitins, making extraction and purification easier, which is highly valuable for an industrial  
28 application. Insect chitins were then subjected to room temperature ionic liquid (RTIL) pretreatment  
29 prior to enzymatic degradation and presented a higher enzymatic digestibility compared to commercial  
30 one whatever was their purity grade and would be thus a more relevant source for the selective  
31 production of *N*-acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose. Moreover, for the first time, the  
32 fermentescibility of chitin hydrolysates was demonstrated with *Scheffersomyces stipitis* used as  
33 ethanologenic microorganism.

34

35 **GRAPHICAL ABSTRACT**



36

37 **KEYWORDS**

38 Chitin, insect biorefinery, room temperature ionic liquid, enzymatic digestibility, fermentescibility.

39

40 **INTRODUCTION**

41

42 Insects are a valuable protein source directly available for human and animal feed and thus a very  
43 promising alternative or a complement to feed the growing world population. In that way, Food and  
44 Agriculture Organization of the United Nations and particularly European Community authorized  
45 recently the use of insects as animal biomass for food and feed (i.e. farm fish) and therefore promoted  
46 the breeding of insects as a new source of proteins (Henry, Gasco, Piccolo & Fountoulaki, 2015; van  
47 Huis, 2013). For sustainable concerns and economic viability, a real bioeconomy can merge by  
48 integrating other insect by-products such as lipids and chitin in a biorefinery concept. Another  
49 important feature is the seasonal independence of production and the homogeneity of production on  
50 farms, making it possible to satisfy the traceability criterion for food/feed applications as well as  
51 medical application for chitin derivatives for example.

52 By the way, the market demand for chitin is more important than the supply chain mainly from the  
53 seafood waste currently. It is important to underline that chitin from insects contains lower amount of  
54 calcium carbonate (<6%) compared to crustaceans (30-50%), and as a consequence, it can be more  
55 easily extracted resulting in a more environmentally friendly process. In addition, higher degrees of  
56 polymerization (DP) of the polymer are preserved with different and sometimes improved mechanical,  
57 gelling, biological and flexibility properties (Díaz-Rojas et al., 2006; Finke, 2007). In the last five  
58 years, a number of publications have been dedicated to the extraction of chitin as well as the  
59 subsequent transformations into bioproducts or biomaterials from different species of insects and

60 different parts of their body (Kaya et al., 2014, 2015a, b, 2017; Liu et al., 2012; Marei et al., 2016;  
61 Rumpold & Schlüter, 2013; Sajomsang & Gonil, 2010).

62 Despite excellent properties such as biocompatibility, biodegradability, adsorption and chelating  
63 ability (Rinaudo, 2006; Younes & Rinaudo, 2015), chitin has been underutilized mainly due to the cost  
64 of the extraction process and the poor solubility in most organic and aqueous solvents. However,  
65 chitin can be converted into *N*-acetyl-D-glucosamine (DP<sub>1</sub>) or *N,N'*-diacetylchitobiose (DP<sub>2</sub>),  
66 providing a very promising application of chitin for mono- or chitooligosaccharides (COS) production.  
67 In addition to their interesting antitumoral and antimicrobial properties, *N*-acetyl-D-glucosamine and  
68 *N,N'*-diacetylchitobiose are also considered as promising platform molecules for osteoarthritis  
69 treatment, drug development and for the production of bioactive oligomers (Cao et al., 2016; Wang et  
70 al., 2008). It is worth to point out that *N*-acetyl-D-glucosamine can also be used as a carbon source by  
71 few fermentative microorganisms (Álvarez-Añorve, Calcagno & Plumbridge, 2005; Evvyernie et al.,  
72 2001; Inokuma, Takano & Hoshino, 2013; Kumar, Jamaluddin, Natarajan, Kaur & Datta, 2000).

73 Recently, we have demonstrated the proof of concept to produce selectively DP<sub>1</sub> and DP<sub>2</sub> with very  
74 competitive yields from commercial shrimp chitin in sequential or simultaneous strategies, including  
75 room temperature ionic liquid (RTIL) and commercial chitinases (Husson et al., 2017). Some RTILs  
76 are also considered as alternative solvents to extract chitin fibers (Qin, Lu, Sun & Rogers, 2010; Kato,  
77 Yamamoto & Kadokawa, 2012; Shamshina, Barber, Gurau, Griggs & Rogers, 2016;) or for chitin  
78 extraction to facilitate chemical and physical modifications, to form hydrogel/film or reversible  
79 sorbent for CO<sub>2</sub> (Aspras, Kamińska, Karzyński, Kawka & Jaworska, 2016; Jaworska, Kozlecki &  
80 Gorak, 2012; Jaworska & Gorak, 2016; Silva, Duarte, Carvalho, Mano & Reis, 2011; Silva, Mano &  
81 Reis, 2017; Shen et al., 2016; Wang, Zhu, Wang, Huang & Wang, 2010; Wu, Sasaki, Irie, & Sakurai,  
82 2008; Xie, Zhang & Li, 2006).

83 In the first part of this study, we focused on the chitin extraction with different purity degree from an  
84 original insect chitin source, the *Bombyx eri*, as described in the Chart 1, used intensively in India for  
85 the production of silk and for nutrition as the moth is an edible insect. Because of the apparent  
86 homogenous larva cuticle, we believed that this insect is a suitable candidate for chitin extraction  
87 (Chaudhari et al., 2011; Kaya et al., 2014, 2015a, b, 2017; Liu et al., 2012; Marei et al., 2016;  
88 Rumpold & Schlüter, 2013; Sajomsang & Gonil, 2010; Vincent & Wegst, 2004). The chemical  
89 composition together with the morphological structure were compared to the commercially available  
90 chitin and to the extracted chitins from shrimp under the same conditions with the aim to highlight the  
91 particularities of chitin from the insect source. In order to have a complete comparison of this  
92 renewable bioresource with those of previous work, we continued with the study on the RTIL  
93 pretreatment of insect chitins before their enzymatic degradation. Finally, the chito-oligosaccharide  
94 hydrolysates generated were used as fermentation substrates by the yeast strain *Scheffersomyces*  
95 *stipitis* to illustrate the feasibility of ethanol production.

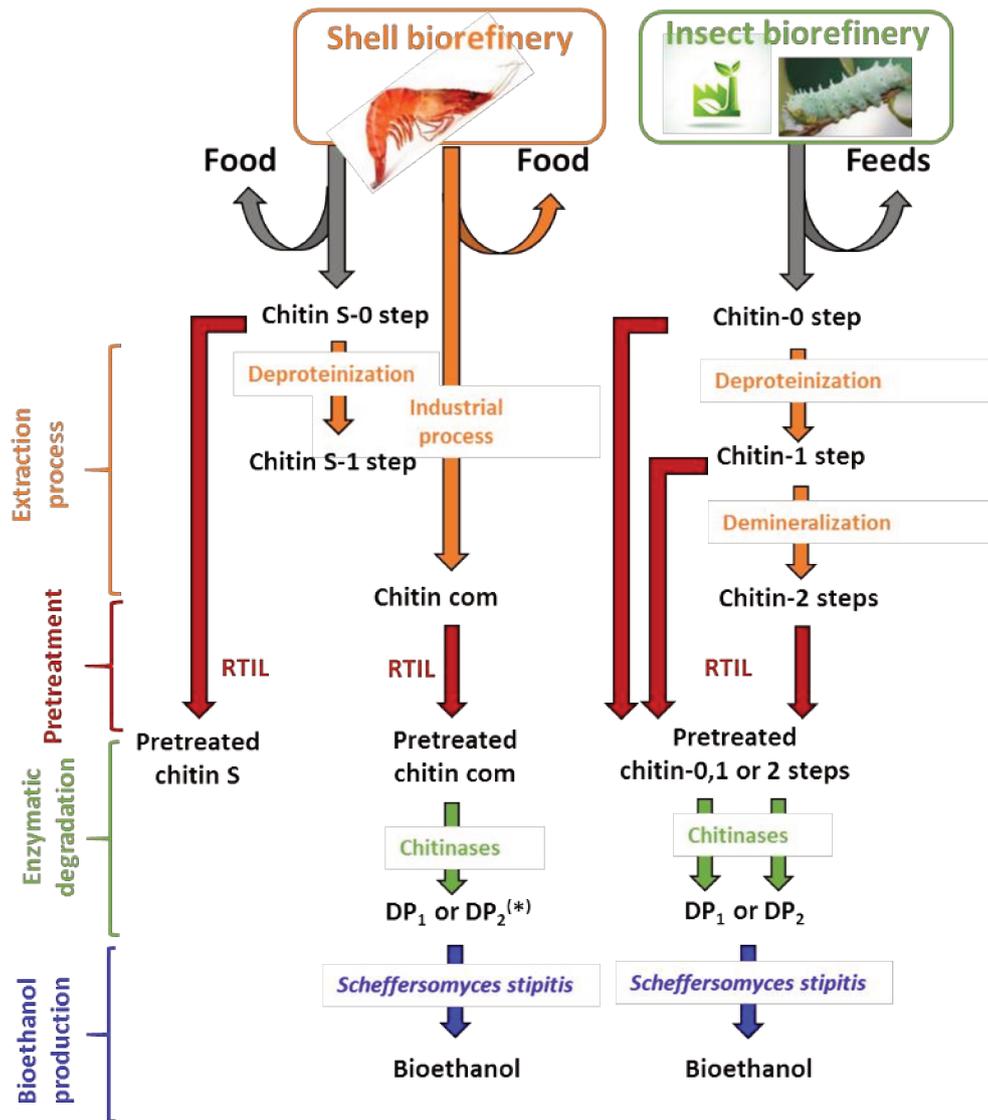


Chart 1 Extracted chitins from *Bombyx eri* larva and shrimp shells sources (\*Husson et al., 2017).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chitin sources

Two animal sources have been used for this study: (a) a commercially available chitin from shrimp shells supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) so-called **chitin com**, or shrimp shells from the local market of Amiens (France) so called **chitin S**; (b) extracted chitins from *Bombyx eri* larva supplied by LepidUP company so-called **chitin** (Amiens, France).

### 2.2 Chemicals, enzymes and strain

110 Mineral acids and bases were used in their highest concentration commercially available, from Sigma-  
111 Aldrich (Steinheim, Germany). Kjeldahl catalyst (Cu) (9% CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O) was supplied by Applichem  
112 panreac ITW reagents. Tashiro indicator was made before use by mixing a solution of red methyl and  
113 green bromocresol with boric acid from Carlo Erba reagent. Chitinase from *Trichoderma viride* and  
114 chitinase from *Streptomyces griseus* were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) with  
115 specific activity ≥ 600 U/g solid and ≥ 200 U/g solid, respectively. One unit will liberate 1.0 mg of *N*-  
116 acetyl-D-glucosamine from chitin per hour at pH 6.0 at 25 °C in a 2 hour assay. 1-ethyl-3-  
117 methylimidazolium acetate ([C<sub>2</sub>mim][OAc], > 98%) was purchased from Solvionic SA (Verniole,  
118 France). *N*-acetylglucosamine purchased from Sigma–Aldrich (Germany) and *N,N'*-diacetylchitobiose  
119 from Elicityl, (France). The strain used in this study was *Scheffersomyces stipitis* CLIB 187 from the  
120 Institut Pasteur collection.

121

### 122 **2.3 Instruments**

123 Thermogravimetric analysis (TGA), solid state CP-MAS <sup>13</sup>C NMR, infra-red (ATR-FTIR), X-ray  
124 diffraction (XDR) and scanning electron microscopy (SEM) were fully described in the supporting  
125 information (SI).

126

### 127 **2.4 Extraction of chitin from insect and shrimp sources**

128

129 *Bombyx eri* larvae were sacrificed by freezing overnight. The insects were then boiled into water for 2  
130 min. After filtration, cooling and removal of water, the insects were passed through an extrusion  
131 apparatus to separate unpurified chitin and the viscous liquid containing mainly the proteins and the  
132 lipids. The residue was washed several times with water followed by ethanol and acetone and dried  
133 under vacuum to obtain unpurified chitin so-called **chitin-0 step**. The deproteinization step was  
134 performed on the unpurified chitin-0 step by adding a NaOH aqueous solution (1 M) and heating at 80  
135 °C for 24 h under stirring. After cooling down the dispersion, the solid was filtered, washed  
136 thoroughly with water MQ until neutral pH followed by ethanol and acetone and dried under vacuum  
137 to give the deproteinized **chitin-1 step**. The resulting solid was then poured into an HCl aqueous  
138 solution 1 M for 35 min at 80 °C. After this time, the solid was filtered, washed with water MQ until  
139 neutral pH, ethanol and acetone and dried under vacuum to give the partially demineralized **chitin-2**  
140 **steps**. **Chitin-0 step**, **chitin-1 step** and **chitin-2 steps** were obtained with a yield of 3.3%, 31.1% and  
141 73.2% respectively. Shrimp shells from local market were separated manually by removing the meat  
142 and the head part of shrimp. The raw shell was washed several times with water followed by ethanol  
143 and acetone and dried under vacuum to obtain unpurified chitin so-called **chitin S-0 step**. **Chitin S-1**  
144 **step** was obtained in a similar way than **chitin-1 step**. **Chitin S-0 step** and **chitin S-1 step** were  
145 obtained with a yield of 51.0% and 17.1% respectively.

146

147 **2.5 Nitrogen content using Kjeldahl method**

148 The nitrogen contents were determined following a method described by Kirk et al. (1950) and  
149 reported in the SI.

150

151 **2.6 RTIL-pretreatment of chitin**

152 The RTIL-pretreatments were performed following a method described by Husson et al. (2017) and  
153 reported in the SI.

154

155 **2.7 Enzymatic hydrolysis**

156 The enzymatic hydrolysis of untreated and pretreated chitins were performed following a method  
157 described by Husson et al. (2017) and reported in the SI.

158

159 **2.10 Yeast fermentation**

160 The yeast fermentations of GlcNAc commercial substrate and hydrolysates were performed following  
161 a method described by Mehmood et al. (2015, 2018) and described in the SI by substituting glucose  
162 with GlcNAc.

163

164 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

165

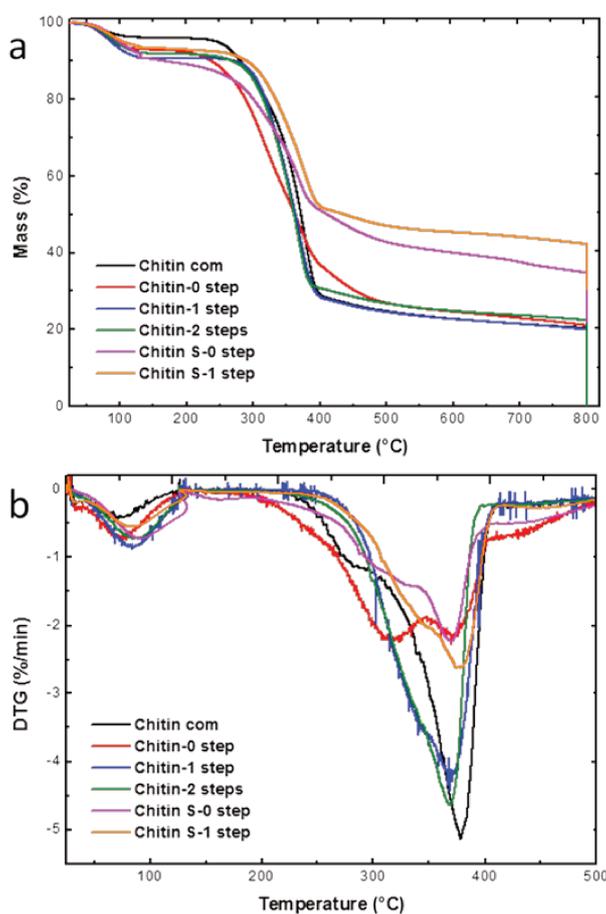
166 **3.1 Chitins extraction from *Bombyx eri* Larva source, characterization and purity**

167

168 Chitin is always present as a protein/CaCO<sub>3</sub>/chitin complex in the shells of crustaceans and insects.  
169 The calcium carbonate deposits provide the rigidity (Rinaudo, 2006) on the structure. Thus, to obtain  
170 purified chitin, or in other word, to eliminate the two other major constituents (proteins and CaCO<sub>3</sub>),  
171 deproteinization by alkali treatment and a demineralization by acidic treatment, are the two steps  
172 classically used questionable in environmental concerns (i.e. harmful effluent wastewater) and  
173 resulting in the degradation of the native chitin, such as depolymerization (Foster & Webber, 1961;  
174 Percot, Viton & Domard, 2003). The lower amount of CaCO<sub>3</sub> present into the insect exoskeleton,  
175 compared to the one of the crustaceans, is of great importance to preserve the physicochemical  
176 properties of chitin during the extraction process (Finke, 2013; Finke, 2007; Kaya et al., 2017).  
177 Therefore, we decided to extract three types of chitin from *Bombyx eri* larva source, with different  
178 purity grades **chitin-0 step**, **-1 step** and **-2steps** respectively (see material and method part). For  
179 comparison, chitins from shrimp sources were obtained under the same extraction conditions and  
180 deproteinization step to get the **chitin S-0 step** and **chitin S-1 step**, respectively (Chart 1).

181 Significant information concerning these complexes may be obtained by TGA and differential thermal  
182 analysis (i) The first mass loss (<10 %) is observed below 100 °C for all samples which corresponded  
183 to the water content (ii) By comparing the DTG<sub>max</sub> (Fig. 1b, Table 1) of the commercial and extracted

184 chitins ranging from 369 to 378 °C, we can conclude that there is no significant thermal stability  
185 difference between shrimp and insect sources. (iii) The effectiveness of the deproteinization step under  
186 the same conditions, independently from the chitin sources can be also noticed. In fact, when alkali  
187 treatment was done on insect or shrimp sources to obtain the **chitin-1 step** or the **chitin S-1 step** (Fig  
188 1b), we observed a clear disappearance of the derivative corresponding to the proteins (from 200 °C to  
189 250 °C). These observations were validated by the results obtained after Kjeldahl analysis (Table 1)  
190 (Kirk, 1950). (iv) The last issue of particular importance is the percentage of impurities depending on  
191 the sources. These percentages of impurities (mainly minerals) were determined by thermogravimetric  
192 analysis at 800 °C under air atmosphere and are reported in Table 1. As expected, values were notably  
193 lower for the extracted chitins from insect sources even without a demineralization step (Table 1).  
194 Under the same experimental conditions, percentages of impurities were found to be 21.7 and 30.3 %  
195 for **chitin S-0 step** and **chitin S-1 step** versus 1.90 and 0.75 % for **chitin-0** and **-1 step**, respectively.



196  
197 Fig. 1 Thermogravimetric (a) and differential thermal analysis (b) of the commercially available and extracted  
198 chitins from shrimp and insect sources under argon atmosphere from 50 to 800 °C following by an isotherm at  
199 800 °C under air for 30 minutes.

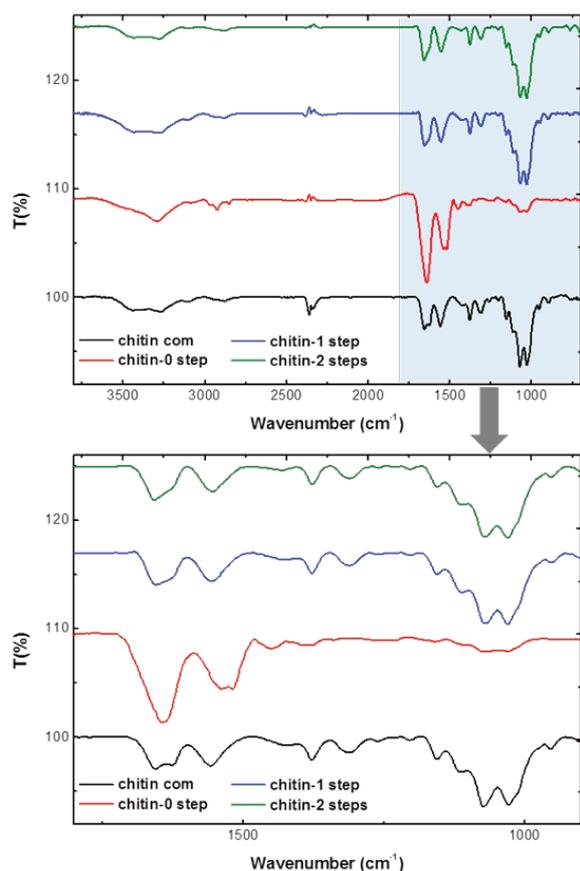
200  
201  
202

203 Table 1.  
 204 Characterization data of the commercially available and extracted chitins from *Bombyx eri* larva and shrimp  
 205 shells sources.  
 206

Chitin	CrI <sup>a</sup> (%)	DA <sup>b</sup> (%)	DTG <sup>c</sup> (°C)	Nitrogen content <sup>d</sup> (N, %)	H <sub>2</sub> O <sup>c</sup> (%)	Ash content <sup>e</sup> (%)	Protein <sup>e</sup> (P, %)	Chitin purity <sup>e</sup> (Q, %)
<b>Extracted chitins</b>								
<b>from <i>Bombyx eri</i> larva</b>								
<b>Chitin -0 step</b>	41	ND	370	10.3	7.02	1.90	45.8	45.0
<b>Chitin-1 step</b>	61	ND	369	6.03	9.16	0.75	0.4	89.7
<b>Chitin-2 steps</b>	66	93	369	6.03	7.92	0.32	0	93.3
<b>from shrimp shells</b>								
<b>Chitin S-0 step</b>	ND	ND	370	9.23	9.23	21.73	49.7	19.3
<b>Chitin S-1 step</b>	42	100	375	2.91	6.53	30.31	ND	<65% <sup>g</sup>
<b>Commercially available chitin from shrimp shells</b>								
<b>Chitin com</b>	75 <sup>f</sup>	87 <sup>f</sup>	378	6.26	3.84	0	0	98.9

207  
 208 (a) calculated using XDR diffractograms and the amorphous subtraction region method; (b) evaluated by solid-state CP-  
 209 MAS <sup>13</sup>C NMR; (c) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere from 50 to 800 °C following by  
 210 an isotherm at 800 °C under air for 30 minutes; (d) evaluated using the Kjeldahl method; (e) evaluated using the methodology  
 211 described by Diaz-Rojas et al. (2006) ; (f) Husson et al., 2017; ND: Not determined.  
 212

213 ATR-FTIR is the most widely used technique for the determination of the crystallographic structure of  
 214 chitin. Indeed, the amide I band of the  $\alpha$ -chitin should have 2 peaks at around 1650 cm<sup>-1</sup> corresponding  
 215 to inter- and intra-molecular hydrogen bonding (Rinaudo, 2006; Younes & Rinaudo, 2015). ATR-  
 216 FTIR spectra of extracted chitins and commercial one is represented in Fig. 2 and in the SI Fig. S1-S6.  
 217 The infrared spectrum of **chitin-0 step** showed barely intense band at around 1050 cm<sup>-1</sup> characteristic  
 218 of the carbon skeleton of chitin compared to commercial chitin. This is due to the presence of a large  
 219 amount of proteins represented by one intense amide band at around 1640 cm<sup>-1</sup> (same observation was  
 220 noticed for the **chitin S-0 step**, fig. S5, SI), whereas the IR spectra of the **chitin-1** and **-2 steps**  
 221 displayed 2 bands at 1630 and 1655 cm<sup>-1</sup> respectively. These two characteristic bands were also  
 222 present in the IR spectra of the commercial chitin and represent the crystalline  $\alpha$  form.  
 223



224  
225  
226  
227  
228

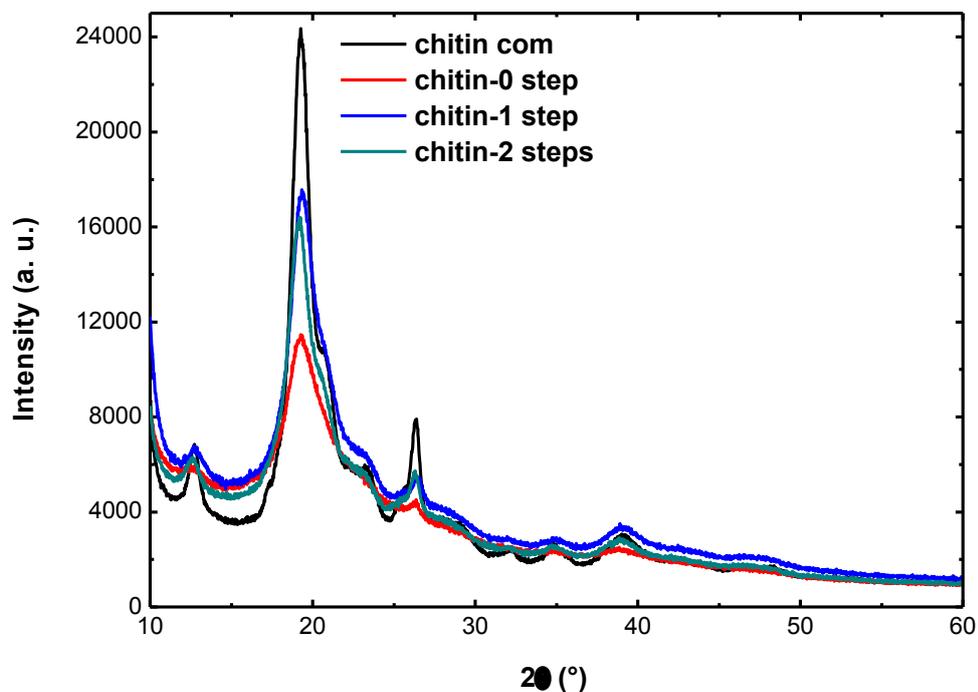
Fig. 2 Top: ATR-FTIR spectra of **chitin com** (black line), extracted **chitin-0 step** (red line), **chitin-1 step** (blue line) and **chitin-2 steps** (green line). Bottom: Zoom of the 1800-700  $\text{cm}^{-1}$  range.

229  $\alpha$ -crystallographic structure has been also confirmed by solid state  $^{13}\text{C}$  NMR since the  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_5$   
230 signals at around 75 and 73 ppm respectively in the extracted chitins from insect are separated which  
231 is not the case in the crystalline  $\beta$ -form (Fig. S10, S12 and S14 in the SI) (Cortizo, Berghoff &  
232 Alessandrini, 2008; Jang, Kong, Jeong, Lee & Nah, 2003). Solid state  $^{13}\text{C}$  NMR is one of the most  
233 accurate to determine the degree of acetylation (DA) in chitin. In the insect cuticle, chitin is always  
234 covalently bound to catechol and scerotin-like proteins (Majtán et al., 2007), and due to the  
235 overlapping of the methyl signal and signals coming from the catechol molecule, we were unable to  
236 calculate the DA of **chitin 0-step** and **chitin 1-step** (See the SI Fig. S10 and S12). For the extracted  
237 **chitin 2-steps** and **chitin S 1-step** the DA were found to be respectively 93 and 100% (See the SI Fig.  
238 S14 and S16) close to the 87% value of the commercial chitin (Fig. S7, in the SI).

239 It is well known that chitin possess crystalline and amorphous regions where the crystallinity is due to  
240 an inter- and intra-molecular hydrogen-bonding network. These crystallinity indexes (CrI) were  
241 calculated on the basis of X-ray diffractograms shown on Figure 3. **Chitin 2-steps** showed similar X-  
242 ray pattern (obtained in the  $2\theta$  range of 10-60°) to the one of commercial chitin with four characteristic

243 crystalline reflections at 19.3 (strongest one), 20.8, 23.3 and 26.4°. The CrI was found to be  
244 significantly higher for the **chitin com**, 75% versus 61% and 66% for the **chitin-1** and **-2 steps**  
245 respectively. Broad signals were obtained in the case of the **chitin 0-step** confirming that further  
246 purification is necessary such as the removal of proteins (same observation was noted for the **chitin S-**  
247 **0 step**, Fig. S18, SI) (Paul et al., 2015).

248



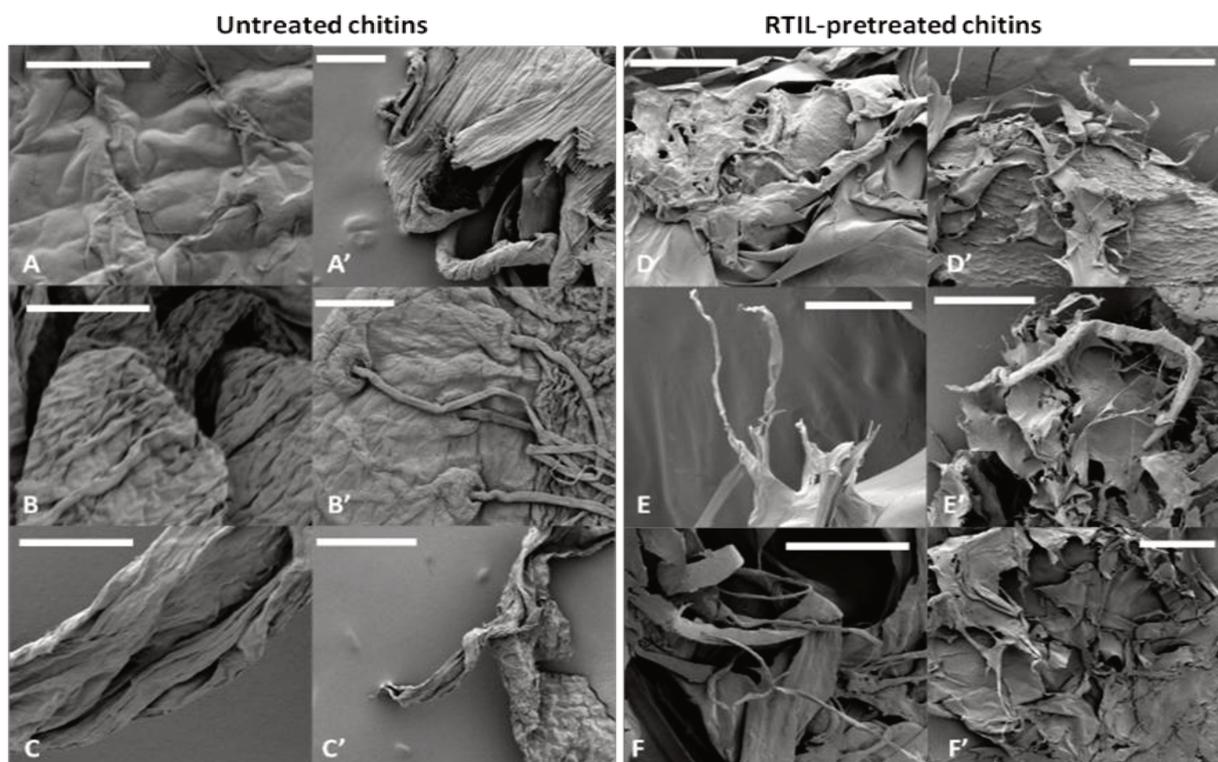
249  
250 Fig. 3 Diffractograms of **chitin com** (black line), **chitin-0 step** (red line), **chitin-1 step** (blue line) and  
251 **chitin-2 steps** (green line).

252

253

254 SEM images of extracted chitins from insect source are represented in Fig. 4. The morphology of the  
255 extracted **chitin S-0** or **-1 step** from shrimp (see SEM images Fig. S23 and S24, SI) showed  
256 nanofibers and pores together in agreement with the literature (El Knidri, 2017; Ifuku, Shervani &  
257 Saimoto, 2013). The extracted chitins from insect, however, presented a smooth surface morphology  
258 where pores were not detected (Fig. 4, A-C).

259



260  
261

262 Fig. 4 SEM images of **chitin-0 step** (A and A') and **[C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin-0 step** (D and  
263 D'); **chitin-1 step** (B and B') and **[C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin-1 step** (E and E'); and **chitin-2**  
264 **steps** (C and C') and **[C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps** (F and F'). Pretreatment: 40 minutes  
265 at 110°C. Bars represent 20 μm (A-F) and 100 μm (A'-F').

266

267 The nitrogen contents of the commercial and extracted chitins were measured, calculated using the  
268 Kjeldahl method (Kirk, 1950) (Table 1). As expected, the nitrogen contents of the extracted chitins  
269 from insect source decreased consistently after deproteinization step, from 10.30 to 6.03%, thereby  
270 confirming the effectiveness of the alkali treatment. After acid treatment, no change was noticed  
271 (6.03%). By comparing the values obtained for the **chitin S-0 step** and the **chitin S-1 step**, 9.23 and  
272 2.91% respectively, same conclusions could be drawn.

273 Using the methodology described by Diaz-Rojas et al. (2006) and assuming that crustacean and insect  
274 shells are mainly composed only of chitin, proteins, minerals, lipids and water, we can estimate the  
275 percentages of chitin and protein for each sample, Q and P respectively (Table 1) and then, the purity  
276 of our extracted chitins. The procedure and equations used for this purpose are described in the  
277 supporting information and Table S1. First, the values obtained for the **chitin-0 step** (45.8%) and the  
278 **chitin S-0 step** (49.7%) meant that the percentage of total proteins was slightly higher in the case of  
279 the shrimp source. In addition, one important information, which could be highlighted from this study,  
280 was the larger ratio of chitin in the crude insect skeleton (**chitin-0 step**, 45.0%) compared to the one of  
281 shrimp (**chitin S-0 step**, 19.3%). This was mainly due to the lower mineral content (1.90% vs

282 21.73%). In addition, after only one step of extraction (deproteinization step), the purity of the **chitin-**  
283 **1 step** was well above the one of the **chitin S-1 step** (89.7 vs 65%). The two extraction steps  
284 performed on the insect skeleton resulted in a chitin with a slightly lower degree of purity than the  
285 commercial one (93.3% vs 98.8%). We also assumed that the deproteinization step removed some  
286 minerals, which explained the values of 0.75 and 30.31% found for the **chitin-1 step** and **chitin S-1**  
287 **step** respectively. In the case of samples containing a large amount of minerals, such as the **chitin S-1**  
288 **step**, the protein content found using this method was not reliable. Then, the percentage of chitin in  
289 this sample has been therefore over-evaluated since we have only considered the presence of minerals,  
290 water and lipids. To sum up, the low mineral contents found in the extracted chitins from insect  
291 source, regardless to the purity grade is of great importance. Indeed, it would facilitate the extraction  
292 process in terms of cost, time saving and waste water.

293

### 294 *3.2 Pretreatment of chitins from Bombyx eri Larva source by Ionic Liquid*

295

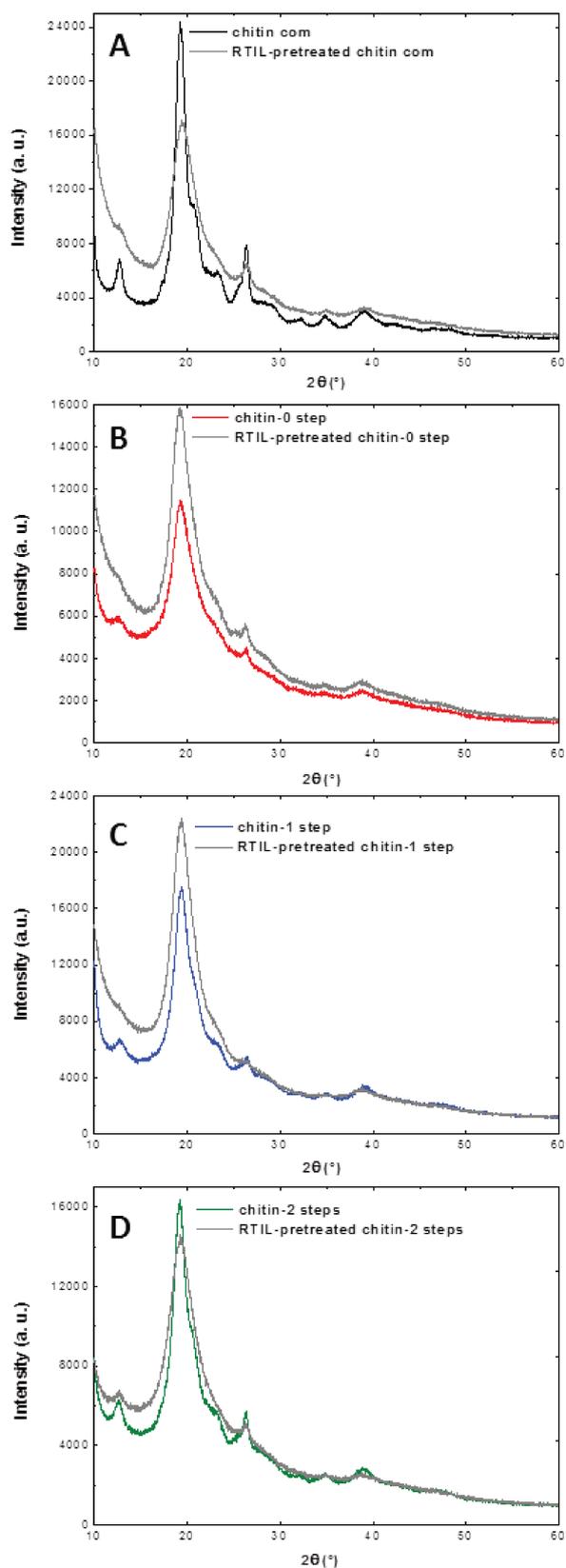
296 Chitin is a polymer even more difficult to dissolve than cellulose in most solvents. Pretreatment  
297 consisting in solubilizing chitin into ionic liquids can overcome this weak solubility and hence  
298 increase the chitin process ability by creating new materials (sponges, films, microspheres, and  
299 aerogels) or to enhance efficiency of subsequent saccharification process. From 2002 with the work  
300 proposed on cellulose by Swatloski et al. RTILs have been intensively used as potential solvents for  
301 some polysaccharides, vegetal biomasses (lignocellulosic biomass) (van Osch et al., 2017; Yoo &  
302 Ragauskas, 2017; Zhang, Hu, & Lee, 2017) and more recently animal biomass (Husson et al., 2017;  
303 Silva, Mano & Reis, 2017, Shen et al., 2016). Keeping in mind large-scale applications, the  
304 ecotoxicity as well as biodegradability are key criterions in selecting the IL for this study. It is well-  
305 known that 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [C<sub>2</sub>mim][OAc] is considered as reasonably non-toxic  
306 and non-corrosive compared to 1-butyl-3-methylimidazolium chloride or 1-ethyl-3-  
307 methylimidazolium chloride (Liu, Wang, Buyondo, Wang & Garver, 2012).

308 Therefore, extracted chitins (**chitin-0**, **-1** and **-2 steps**) were pretreated under mild conditions with  
309 [C<sub>2</sub>mim][OAc] as previously described (Husson et al., 2017). The effect of RTIL pretreatment on  
310 chitin structures were investigated, characterized (Table 2 and SI) and correlated with the data  
311 obtained in the enzymatic hydrolysis part.

312 SEM observation revealed a significant effect of RTIL-pretreatment on morphology and  
313 microstructure of all the extracted chitins. Such pretreatment created delaminated structures, detached  
314 thin sheets and, occasionally, separated microfibers, from a denser and smoother untreated chitin  
315 material (Fig. 4, A-C vs D-F).

316 The  $\alpha$ -chitin structure remained for the pretreated **chitin-1** and **-2 steps** as shown in the FT-IR spectra  
317 (SI, Fig. S2 C/D) with the presence of the amine I and II bands before and after pretreatment, in  
318 agreement with our previous work (Husson et al, 2017). X-ray diffraction was also used to follow the

319 change of chitin crystalline structure after pretreatment. For untreated and pretreated samples, the  
320 19.3° (strongest one) and 26.4 °peak positions remains essentially the same. However, crystallinity of  
321 regenerated **chitin-1** and **-2 steps** decreased if RTIL pretreatments were applied, (Fig. 6 and Table 2).  
322 These changes in crystallinity could be caused either by disruption of the crystal structure itself or  
323 changes in particle structure (surface corrugation) connected with defects in crystal structure of  
324 particles (Jaworska & Górak, Zdunek, 2017).



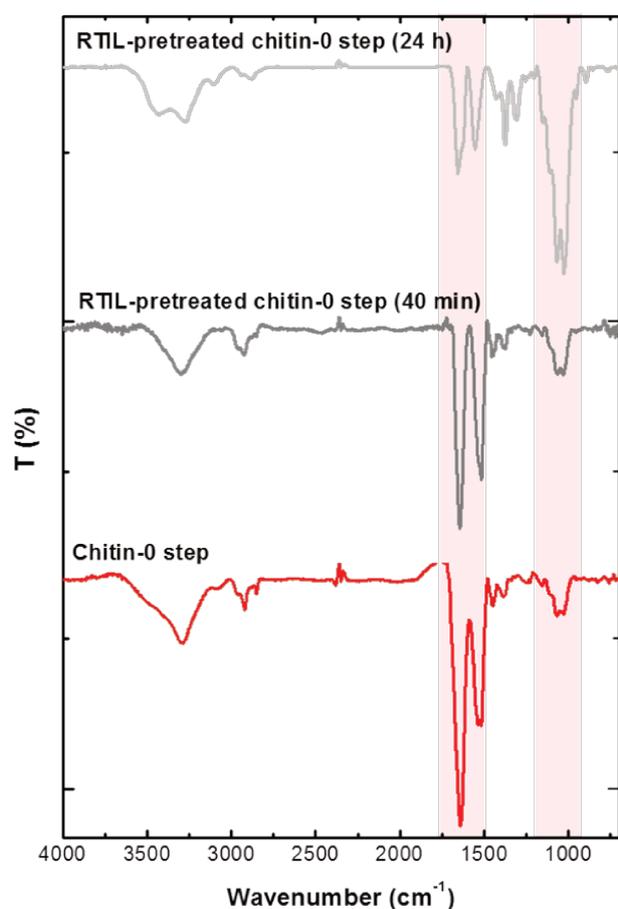
325  
 326  
 327  
 328  
 329

Fig. 6 Diffractograms of untreated and [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin com (A), of untreated and [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin-0 step (B), of untreated and [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin-1 step (C) and of untreated and [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps (D).

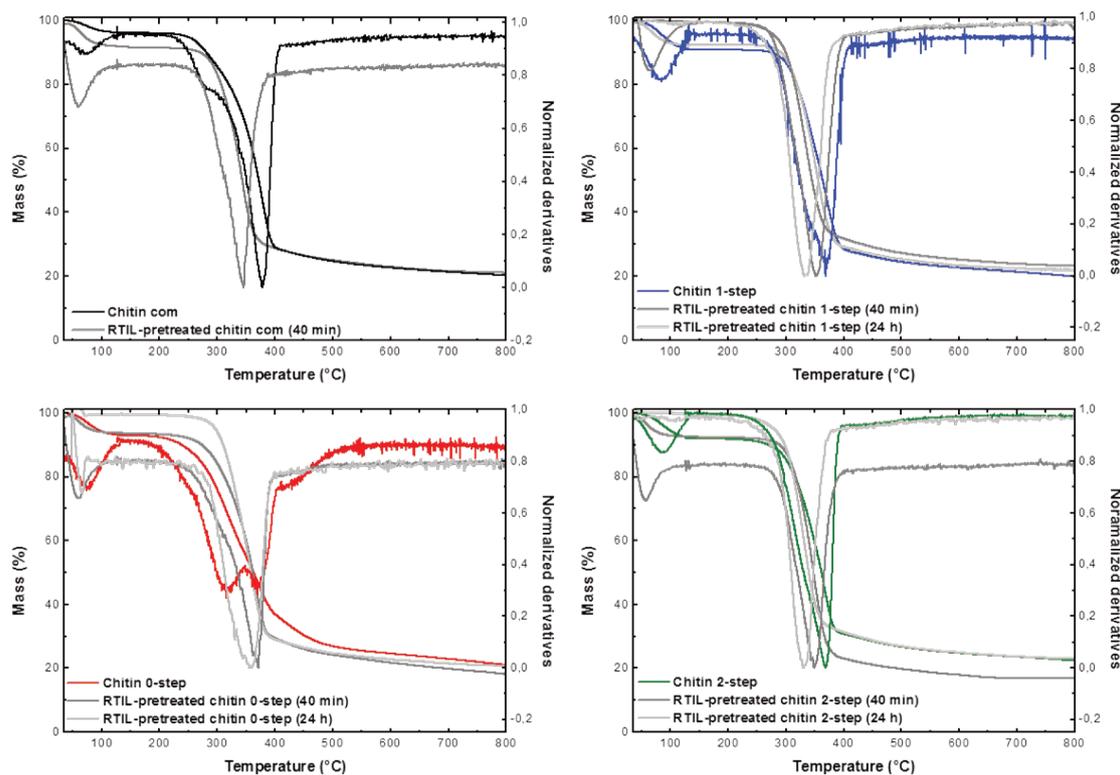
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345

The decrease of CrI would be consistent with the above SEM observations. In addition, DAs were not affected by the pretreatment (see SI, fig. S8, S11, S13 and S15). On the contrary, a significant decrease in the  $DTG_{max}$  after RTIL-pretreatment was observed for the **chitin com** and the extracted **chitin-1** and **2 steps** (Fig. 5 and Table 1) indicating the depolymerization of the polymer or a change from crystalline to amorphous form as observed for lignocellulosic biomass.

In addition, we assume that RTIL-pretreatment for 40 minutes led to a higher chitin purity since, in all cases, the disappearance of the band corresponding to the proteins was observed by TGA analysis (Fig. 1). This observation was confirmed with the loss of the band corresponding to the proteins at around  $1640\text{ cm}^{-1}$  in the IR spectra especially in the case of the pretreated **chitin-0 step** (Fig. 5B). From that perspective and with the aim of determining the nitrogen content in the extracted chitins, **chitin-0**, **-1** and **-2 steps** but also **chitin S-0 step** were pretreated for 24h following the procedure described previously. After 24 h of RTIL-pretreatment, chitin solubility increased suggesting that RTIL disrupted intra-chain bonds improving solubility and the removal of some residual proteins.



346  
347 Fig. 7 ATR-FTIR spectra of untreated and  $[C_2mim][OAc]$ -pretreated **chitin-0 step** for 40 minutes  
348 and 24h.  
349



350  
 351 Fig. 5 Thermogravimetric and differential thermal analysis of untreated and  $[C_2mim][OAc]$ -  
 352 pretreated chitin com (A), chitin-0 step (B), chitin-1 step (C) and chitin-2 steps (D), under argon  
 353 atmosphere.

354  
 355 Decreases of the CrIs, calculated from the X-ray diffractograms, were observed in the case of the  
 356 chitin-1 and -2 steps after 24 h of pretreatment (Table 1, see also SI Fig. S21 and S22).  
 357 Depolymerization of the polymer and/or change from crystalline to amorphous form were also  
 358 confirmed with the decrease of the  $DTG_{max}$ . The  $DTG_{max}$  values obtained after 24h of pretreatment  
 359 were significantly lower than those obtained after 40 minutes (Table 2, Fig. 5 and see also the SI, Fig.  
 360 S29, S31-S33). These observations are consistent with the SEM micrographs, where thin layers of  
 361 chitin were obtained (see the SI, Fig. S25-28).

362 The RTIL-pretreatment purification of the chitin-0 step has been also highlighted thanks to the  
 363 determination of the nitrogen content (See SI, Table S1). Indeed, after 40 minutes and 24 h of RTIL-  
 364 pretreatment of the extracted chitin-0 step, this percentage decreased from 10.3 to 9.2 and 7.5%  
 365 respectively. More recently, it was noticed after the 24 h RTIL-pretreatment of the chitin S-0 step, the  
 366 nitrogen content dropped from 9.23 to 5.76%. These data were consistent with the IR spectra of the  
 367 pretreated chitins depicted in Figure 7. In agreement with literature data, the  $[C_2mim][OAc]$  was not  
 368 only a good solvent to pretreat chitin but could also remove proteins as well as minerals residues (Qin,  
 369 Lu, Sun, & Rogers, 2010).

370

371

372 Table 2. Characterization data of the untreated and RTIL-pretreated chitins.

Chitin	CrI <sup>a</sup> (%)	DA <sup>b</sup> (%)	N content <sup>c</sup> (%)	Ash content <sup>d</sup> (%)	DTG <sub>max</sub> <sup>d</sup> (°C)
<b>Extracted chitins from <i>Bombyx eri</i> larva</b>					
Chitin-0 step	41	ND	10.3	1.90	370
RTIL-pretreated Chitin-0 step (40min)	38	100	9.2	0.36	371
RTIL-pretreated Chitin-0 step (24h)	63	ND	7.5	0.57	354
Chitin-1 step	61	ND	6.03	0.75	369
RTIL-pretreated Chitin-1 step (40min)	46	93	ND	<0.25	352
RTIL-pretreated Chitin-1 step (24h)	41	ND	5.85	<0.25	331
Chitin-2 steps	66	93	6.03	0.32	369
RTIL-pretreated Chitin-2 steps (40min)	42	95	ND	1.03	349
RTIL-pretreated Chitin-2 steps (24h)	34	ND	ND	ND	330
<b>Extracted chitins from shrimp shells</b>					
Chitin S-0 step	ND	ND	9.23	21.73	370
RTIL-pretreated Chitin S-0 steps (24h)	58	ND	5.79	14.87	358
Chitin S-1 step	42	100	2.91	30.31	375
<b>Commercially available chitin from shrimp shells</b>					
Chitin com	75 <sup>e</sup>	87 <sup>e</sup>	6.26	<0.25	378
Purified chitin com	82	92	6.11	ND	382
RTIL-pretreated Chitin com (40min)	50 <sup>e</sup>	91 <sup>e</sup>	ND	0.26	347

373

374 (a) calculated using XDR diffractograms and the amorphous subtraction region method; (b) evaluated by solid-state CP-MAS  
375 <sup>13</sup>C NMR; (c) evaluated using the Kjeldahl method; (d) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen  
376 atmosphere from 50 to 800 °C following by an isotherm at 800 °C under air for 30 minutes; (g) Husson et al., 2017; ND : Not  
377 determined.

378

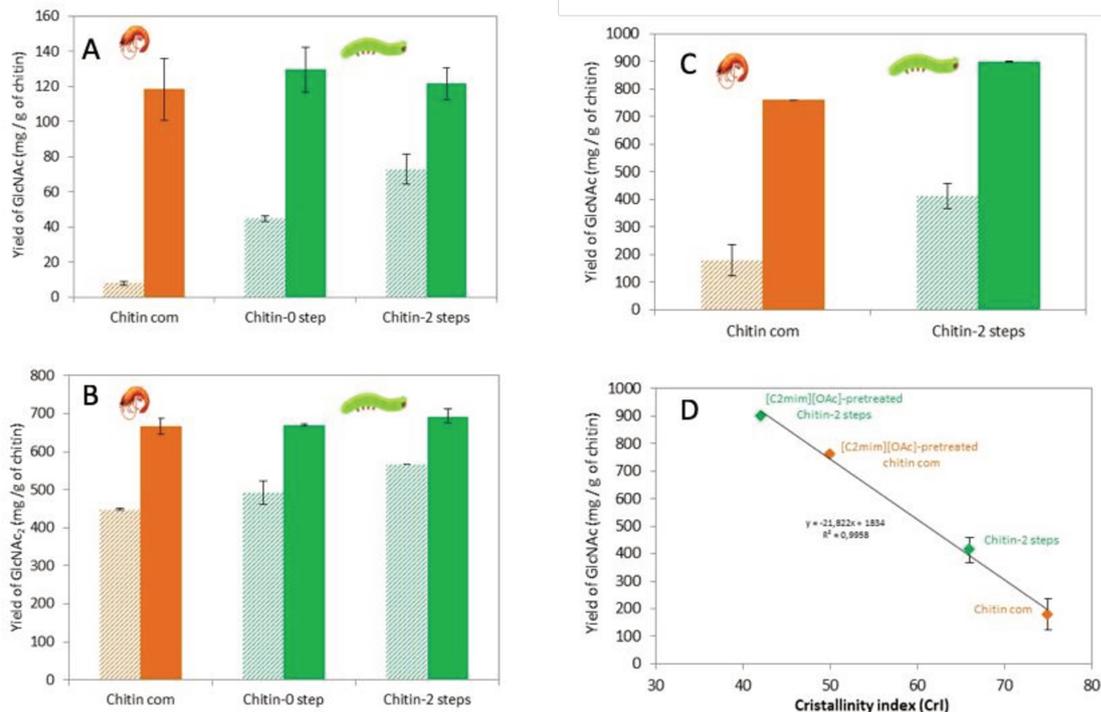
### 379 3.3 Enzymatic hydrolysis of chitins: impact of [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment.

380

381 Impact of [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment on the performances of enzymatic hydrolysis of the chitins  
382 extracted from *Bombyx eri* larva at different purity grades was investigated. Hydrolysates obtained  
383 with the chitinase from *Trichoderma viride* contained mainly the *N*-acetylglucosamine monomer while  
384 chitinase from *Streptomyces griseus* led to a hydrolysate enriched in *N,N'*-diacetylchitobiose dimer.  
385 This selectivity was maintained whatever the purity of chitins and the implementation of  
386 [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment. An opposite result was recently reported by Berton et al. (2018) who  
387 suggested that the selectivity of the chitinase from *S. griseus* could be influenced by the purity grade  
388 of chitin (Berton, Shamshina, Ostadjoo, King & Rogers, 2018). In this context, we thus suggested that  
389 the source of chitin would be also a potential influencing parameter.

390

391



392  
393

394 Fig. 8 (A) *N*-Acetylglucosamine or (B) *N,N'*-diacetylchitobiose yield (mg per g of chitin) at 24 h of  
395 enzymatic hydrolysis of chitins, before (stripped bars) and after (full bars) RTIL-pretreatments,  
396 catalyzed by the respective chitinase from *T. viride* (top) or *S. griseus* (bottom); (C) *N*-  
397 Acetylglucosamine yields obtained by the enzymatic hydrolysis of extracted and commercial chitins in  
398 aqueous buffer before (stripped bars) and after (full bars) [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment (these reactions  
399 were catalyzed by the chitinase from *S. griseus* for 24 h then supplemented with the chitinase from *T.*  
400 *viride* for 12 h.) and (D) correlation of *N*-acetylglucosamine yields and initial CrI of chitins before  
401 enzymatic hydrolysis.

402

403 Concerning the chitinase from *T. viride*, the data reported in the Figure 8 (A) clearly showed that the  
404 untreated chitins (**chitin-0 step** and **chitin-2 steps**), regardless their purity, exhibited a higher  
405 enzymatic digestibility (44.8 and 72.9 mg/g, respectively) than **chitin com** (7.9 mg/g). After  
406 [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment, enzymatic hydrolysis was significantly improved and the yields obtained  
407 for the three distinct substrates were similar (123 mg/g in average). Likewise, Figure 8 (B) showed  
408 that hydrolyses of untreated chitins catalyzed by the chitinase from *S. griseus* led to yields of GlcNAc<sub>2</sub>  
409 superior to 400 mg/g whatever the sources and the purity grade. It could be noticed that insect chitins  
410 present again a better digestibility with this enzyme in comparison to **chitin com**. After  
411 [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment, an increase of the performances by a factor 1.4 was observed and very  
412 competitive yields of GlcNAc<sub>2</sub> can be achieved for the three chitins. Interestingly, the yield obtained  
413 for **chitin com** (667.8 mg/g) was similar to those obtained for the **chitin-0 step** (669.5 mg/g).

414 Then, the combination of the two chitinases in two subsequent hydrolysis steps were applied to **chitin-**  
415 **2 steps** and **chitin com** before and after [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment (Fig. 8C). The untreated **chitin-2**  
416 **steps** exhibited again a higher digestibility (413.3 mg/g) than the untreated **chitin com** (179.1 mg/g).  
417 After [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment, the production of GlcNAc from the **chitin-2 steps** was  
418 significantly improved (by a factor 2.2) and achieved a very promising value of 899.2 mg/g of chitin  
419 (vs 460 mg/g for chitin com). Reporting yield of GlcNAc as a function of CrI (Fig. 8D) evidenced a  
420 linear relationship between the structural parameter and the enzymatic digestibility suggesting that the  
421 performances of enzymatic depolymerisation could be counter-balanced by the decrease of the CrI. In  
422 this way, [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment remains thus a promising pretreatment to disrupt the highly  
423 ordered intra- and inter-chain hydrogen bond network of chitin allowing also to efficiently produce  
424 COS by enzymatic route.

425

### 426 **3.4 Fermentescibility of enzymatic hydrolysates.**

427

428 The enzymatic hydrolysates were then tested for their ability to be valorized by microbial  
429 fermentation. The molecule of interest targeted here was the ethanol which could be obtained from the  
430 yeast *Scheffersomyces stipitis* on GlcNAc (Inokuma, Hasunuma, & Kondo, 2016; Inokuma, Matsuda,  
431 Sasaki, Hasunuma & Kondo, 2018). Thus, we experimented this strain fermentation in aerobic  
432 conditions in classical shake flasks with cotton plugs in a culture medium containing no ethanogenic  
433 substrate (Mehmood et al., 2015, 2018) supplemented either with commercial GlcNAc or with the  
434 enzymatic hydrolysates of [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreated chitins from shrimp shells or *Bombyx eri* larva. *S.*  
435 *stipitis* could grow and consume totally the substrates in all the conditions tested (see SI, Fig. S34). An  
436 ethanol production was observed on all the samples containing the monomer GlcNAc, whatever their  
437 origin whereas no ethanol could be detected on chitin hydrolysates rich in dimer GlcNAc<sub>2</sub> (see Table  
438 S2, SI).

439 Without optimization of the parameters, the higher yield was obtained on commercial GlcNAc, equal  
440 to 0.19 g ethanol/g GlcNAc. The *S. stipitis* fermentations on chitin hydrolysates led to ethanol yields  
441 of 0.14 g/g for shrimp chitin and 0.09 g/g for *Bombyx eri* larva chitin, corresponding to maximum  
442 theoretical yields of 32.5% and 22.3% respectively. These values are lower compared to commercial  
443 substrates (44.7%), but show undeniably the feasibility of the valorization process of chitin issued  
444 from shellfish or insect in ethanol. These results also imply that all the products used in the first steps  
445 of chitin extraction (or co-products formed simultaneously) like deproteinization, demineralization or  
446 RTIL-pretreatment were not a radical hindrance to yeast fermentation, even if a lot of work remains to  
447 accomplish in order to optimize the ethanolic production. One can suppose that the fermentation  
448 process could be realized with another fermentative microorganism in order to produce other  
449 molecules of interest with higher added value than ethanol.

450

#### 451 **4. CONCLUSIONS**

452 Herein, we reported for the first time the chitin extraction from a new species of insect by  
453 demonstrating that *Bombyx eri* larva is a source of chitin with great potential since the skeleton  
454 contains 45% of chitin versus 19.3% for the shrimp shells. Moreover, after only one step of extraction,  
455 we obtained a chitin with the high purity grade of almost 90%, mainly because of the low mineral  
456 contents. In addition, untreated chitins extracted from *Bombyx eri* larva, exhibit a better enzymatic  
457 digestibility in comparison to the commercially available chitin from shrimp shells. After  
458 [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment, a very competitive yields of GlcNAc can be achieved by chitinase-  
459 catalyzed hydrolysis, suggesting that *Bombyx eri* larva would be thus a more relevant source of chitin  
460 for selective enzymatic production of COS. Finally, our fermentation results showed for the first time  
461 that *S. stipitis* produced ethanol on commercial GlcNAc in aerobic conditions, but also on enzymatic  
462 hydrolysates of chitins derived from shrimp and from the new *Bombyx eri* larva insect source after a  
463 [C<sub>2</sub>mim][OAc]-pretreatment. This is the first report of a natural wild-type yeast strain producing  
464 ethanol on chitin derivatives, highlighting the great potentialities of this substrate. Some further  
465 optimization would nevertheless be necessary for a cost-effective production of high added value  
466 molecules in a concept of insect biorefinery. Nevertheless, we believe that chitin extracted from  
467 insects can be a complementary and competitive resource for the chitin market.

468

#### 469 **ACKNOWLEDGEMENTS**

470 ANVN thanks the ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche  
471 for financial support.

472

#### 473 **References**

474 Álvarez-Añorve, L. I., Calcagno, M. L., & Plumbridge, J. (2005). Why does *Escherichia coli* grow  
475 more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric  
476 activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *Journal of Bacteriology.*, 187(9), 2974-2782.

477

478 Aspras, I., Kamińska, M., Karzyński, K., Kawka, M. & Jaworska M. M. (2016). The influence of  
479 selected ionic liquids on activity of chitin deacetylase. *Chemical and Process Engineering*, 37(1), 77-  
480 82.

481

482 Berton, P., Shamshina, J. L., Ostadjoo, S., King, C. A., & Rogers, R. D. (2018). Enzymatic hydrolysis  
483 of ionic liquid-extracted chitin. *carbohydrate Polymers*, 199, 228-235.

484

485 Cao, T., Li, Y., Jiang, L., Yuan, L., Dong, L., Li, Y., & Yin, S. (2016). Novel biologically active series  
486 of N-acetylglucosamine derivatives for the suppressive activities on GAG release. *Carbohydrate*  
487 *Research*, 433, 73-79.

488

489 Chaudhari, S. S., Arakane, Y., Specht, C. A., Moussian, B., Boyle, D. L., Park, Y., Kramer, K. J.,  
490 Beeman, R. W., & Muthukrishnan, S. (2011). Knickkopf protein protects and organizes chitin in the  
491 newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United*  
492 *States of America*, 108, 17028-17033.

493

494 Cortizo, M. S., Berghoff, C. F., & Alessandrini, J. L. (2008). Characterization of chitin from *Illex*  
495 *argentinus* squid pen. *Carbohydrate Polymers*, 74, 10-15.

496

497 Díaz-Rojas, E. I., Argüelles-Monal, W. M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J., &  
498 Goycoolea, F. M. (2006). Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin  
499 from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience*, 6, 340-347.

500

501 EL Knidri, H., Belaabed, R., El khalfaouy, R. Laajeb, A., Addaou, A., & Lahsini, A. (2017).  
502 Physicochemical characterization of chitin and chitosan croducted from *Parapenaeus Longirostris*  
503 shrimp shell wastes. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8, 3648-3653.

504

505 Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2001). Conversion of  
506 chitinous wastes to hydrogen gas by *clostridium paraputrificum* M-21. *Journal of Bioscience and*  
507 *Bioengineering*, 91(4), 339-343.

508

509 Finke, M. D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26, 105-115.

510

511 Finke, M. D. (2013). Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology*, 32, 27-  
512 36.

513

514 Foster, A. B. & Webber, J. M. (1961) Chitin. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 1960, 15, 371-  
515 393.

516

517 Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., & Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet  
518 of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1-22.

519

520 Husson, E., Hadad, C., Huet, G., Laclef, S., Lesur, D., Lambertyn, V., Jamali, A., Gottis, S., Sarazin  
521 C. & Nguyen Van Nhien, A. (2017). The effect of room temperature ionic liquids on the selective

522 biocatalytic hydrolysis of chitin via sequential or simultaneous strategies. *Green Chemistry*, 19, 4122-  
523 4133.

524

525 Ifuku, S., Shervani, Z., & Saimoto, H. (2013). Chitin nanofibers, preparations and applications.  
526 Chapter from the book *Advances in Nanofibers*.

527

528 Inokuma, K., Takano, M., & Hoshino, K. (2013). Direct ethanol production from N-acetylglucosamine  
529 and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochemical Engineering Journal*, 72, 24–32.

530

531 Inokuma, K., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2016). Ethanol production from N-acetyl-D-glucosamine  
532 by *Scheffersomyces stipitis* strains. *AMB express*, 6, 83-90.

533

534 Inokuma, K., Matsuda, M., Sasaki, D., Hasunuma, T. & Kondo, A. (2018). Widespread effect of N-  
535 acetyl-D-glucosamine assimilation on the metabolisms of amino acids, purines, and pyrimidines in  
536 *Scheffersomyces stipitis*. *Microbial Cell Factories*, 17, 153-164.

537

538 Jang, M.-K., Kong, B.-G., Jeong, Y.-I., Lee, C. H. & Nah, J.-W. (2003). Physicochemical  
539 characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer*  
540 *Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 3423-3432.

541

542 Jaworska, M. M., Kozlecki, T., & Gorak, A. (2012). Review of the application of ionic liquids as  
543 solvents for chitin. *Journal of Polymer Engineering*, 32, 67-69.

544

545 Jaworska, M. M., & Górak Zdunek, A. (2017). Modification of chitin particles with ionic liquids  
546 containing ethyl substituent in a cation. *Advances in Materials Science and Engineering 2017*, 1-9.

547

548 Kaya, M., Baublys, V., Can, E., Šatkauskienė, I., Bitim, B., Tubelyte, V. & Baran, T. (2014).  
549 Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*)  
550 and a crustacean species (*Oniscus asellus*). *Zoomorphology*, 133, 285–293.

551

552 Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E., & Tubelyte, V. (2015). First chitin  
553 extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin.  
554 *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 126-132.

555

556 Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, Cakmak, M. Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Mentés, A., &  
557 Sezen, G. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and

558 antioxidant activities from Cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess*  
559 *Engineering*, 20, 168-179.

560

561 Kaya, M., Sargin, I. Sabeckis, I., Noreikaite, D., Erdonmez, D., Salaberria, A. M., Labidi, J., V.  
562 Baublys, V., & Tubelyte, V. (2017). Biological, mechanical, optical and physicochemical properties of  
563 natural chitin films obtained from the dorsal pronotum and the wing of cockroach. *Carbohydrate*  
564 *Polymers*, 163, 162-169.

565

566 Kirk, P. L. (1950). Kjeldahl Method for Total Nitrogen. *Analytical Chemistry*, 22, 354-358.

567

568 Kumar, M. J., Jamaluddin, M. S., Natarajan, K., Kaur, D. & Datta, A. (2000). The inducible N-  
569 acetylglucosamine catabolic pathway gene cluster in *Candida albicans*: Discrete N-acetylglucosamine-  
570 inducible factors interact at the promoter of NAG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*  
571 *of the United States of America*, 97(26),14218-14223.

572

573 Liu, S., Wang, Y., Buyondo, J. P., Wang, Y., & Garver, M. (2012). Biochemical Conversion. In P. R.  
574 Stuart and M. M. El-Halwagi (Eds.), *Integrated biorefineries: design, analysis, and optimization* (1st  
575 ed.).

576

577 Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., & Yang, Q. (2012). Extraction  
578 and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, 17, 4604-  
579 4611.

580

581 Marei, N. H., El-Samie, E. A., Salah, T., Saad, G. R., & Elwahy, A. H.M. (2016). Isolation and  
582 characterization of chitosan from different local insects in Egypt. *International Journal of Biological*  
583 *Macromolecules*, 82, 871-877.

584

585 Majtán, J., Biliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G., & Simúth, J. (2007). Isolation and  
586 characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological*  
587 *Macromolecules*, 40, 237-241.

588

589 Mehmood, N., Husson, E., Jacquard, C., Wewetzer, S., Büchs, J., Sarazin, C., & Gosselin, I. (2015).  
590 Impact of two ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and 1-ethyl-3-methylimidazolium  
591 methylphosphonate, on *Saccharomyces cerevisiae*: metabolic, physiologic, and morphological  
592 investigations. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 17-30.

593

594 Mehmood, N., Alayoubi, R., Husson, E., Jacquard, C., Büchs, J., Sarazin, C., & Gosselin, I. (2018).  
595 *Kluyveromyces marxianus*, an attractive yeast for ethanolic fermentation in the presence of  
596 imidazolium ionic liquids. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 887-902.  
597

598 Paul, T., Halder, S. K., Das, A., Ghosh, K., Mandal, A., Barman, P., Das Mohapatra, P. K., Pati, B. R.,  
599 & Mondal, K. C. (2015). Production of chitin and bioactive materials from Black tiger shrimp  
600 (*Penaeus monodon*) shell waste by the treatment of bacterial protease cocktail. *3 Biotech*, 5, 483-493.  
601

602 Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells.  
603 *Biomacromolecules*, 4, 12-18.  
604

605 Qin, Y., Lu, X., Sun, N., & Rogers, R. D. (2010). Dissolution or extraction of crustacean shells using  
606 ionic liquids to obtain high molecular weight purified chitin and direct production of chitin films and  
607 fibers. *Green Chemistry*, 12, 968-971.  
608

609 Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*,  
610 31(7), 603-632.  
611

612 Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source  
613 for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 1-11.  
614

615 Sajomsang, W., & Gonil, P. (2010). Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs.  
616 *Materials Sciences and Engineering: C*, 30, 357-363.  
617

618 Setoguchi, T. Kato, T., Yamamoto, K. & Kadokawa, J.-I. (2012). Facile production of chitin from crab  
619 shells using ionic liquid and citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 861-  
620 864.  
621

622 Shen, X., Shamshina, J. L., Berton, P., Bandomir, J., Wang, H., Gurau, G. & Rogers, R. D. (2016).  
623 Comparison of hydrogels prepared with ionic-liquid-isolated vs commercial chitin and cellulose. *ACS*  
624 *Sustainable Chemistry & Engineering*, 4, 471-480.  
625

626 Shamshina, J. L., Barber, P. S., Gurau, G., Griggs, C. S., & Rogers, R. D. (2016). Pulping of  
627 crustacean waste using ionic liquids: to extract or not to extract. *ACS Sustainable Chemistry &*  
628 *Engineering*, 4, 6072-6081.  
629

630 Silva, S. S., Duarte, A. R. C., Carvalho, A. P., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2011). Green processing of  
631 porous chitin structures for biomedical applications combining ionic liquids and supercritical fluid  
632 technology. *Acta Biomaterialia*, 7, 1166-1172.

633

634 Silva, S. S., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2017). Ionic liquids in the processing and chemical  
635 modification of chitin and chitosan for biomedical applications. *Green Chemistry*, 19, 1208-1220.

636

637 Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2002). Dissolution of Cellulose with  
638 Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 4974-4975.

639

640 van Huis, A., van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P.  
641 (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. food and agriculture organization of  
642 the united nations, Rome.

643

644 van Osch, D. J. G. P., Kollau, L. J. B. M., van den Bruinhorst, A., Asikainen, S., Rocha, M. A. A., &  
645 Kroon, M. C. (2017). Ionic liquids and deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass fractionation.  
646 *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19, 2636-2665.

647

648 Vincent, J. F. V., & Wegst, U. G. K. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle.  
649 *Arthropod Structure & Development*, 33, 187-199.

650

651 Wang, S.-L., Lin, H.-T., Liang, T.-W., Chen, Y.-J., Yen, Y.-H. & Guo, S.-P. (2008). Reclamation of  
652 chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials.  
653 *Bioresource Technology*, 2008, 99, 4386-4393.

654

655 Wang, W.-T., Zhu, J., Wang, X.-L., Huang, Y., & Wang, Y.-Z. (2010). Dissolution behavior of chitin  
656 in ionic liquids. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 49, 528-541.

657

658 Wu, Y., Sasaki, T., Irie, S., & Sakurai, K. (2008). Ionic liquid as useful media for dissolution,  
659 derivatization, and nanomaterial processing of chitin. *Polymer*, 49, 2321-2327.

660

661 Xie, H., Zhang, S., & Li, S. (2006) Chitin and chitosan dissolved in ionic liquids as reversible sorbents  
662 of CO<sub>2</sub> *Green Chemistry*, 8, 630-633.

663

664 Yoo, C. G., Pu, Y., & Ragauskas, A. J. (2017). Ionic liquids: Promising Green Solvents for  
665 Lignocellulosic Biomass Utilization. *Current Opinion in Green Sustainable Chemistry*, 5, 5-11.

666

667 Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure,  
668 properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.

669

670 Zhang, Q., Hu, J., & Lee, D.-J. (2017). Pretreatment of biomass using ionic liquids: Research updates.  
671 *Renewable Energy*, 111, 77-84.

672

673

## Résumé

La biomasse lignocellulosique (BLC), composée des déchets végétaux agricoles et/ou forestiers, représente une ressource renouvelable prometteuse pour la production de bioéthanol de deuxième génération et faire face à l'épuisement des énergies fossiles. Le procédé de valorisation de la BLC appliqué ici comprend une étape de prétraitement par deux liquides ioniques (LI) hydrophiles dérivés d'imidazolium, le 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] et le 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], puis une hydrolyse enzymatique par des cellulases de *Trichoderma reesei* et des xylanases de *Trichoderma longibrachiatum*, suivie d'une étape de fermentation éthanolique microbienne testée sur quatre espèces de levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces shehatae* et *Scheffersomyces stipitis*. Deux BLC réelles ont été étudiées : le saule blanc (résidu forestier) et le son de blé désamidonné (résidu agricole). Les résultats ont montré que le prétraitement des BLC aux LI à 35°C permet une augmentation de la digestibilité enzymatique des polysaccharides (rendements en glucose jusqu'à +56,7% et rendements en xylose jusqu'à +31,1%) par rapport au contrôle sans prétraitement. De plus, la performance des procédés de fermentation éthanolique est améliorée d'un facteur 1,3 à 4,6 en fonction du substrat étudié et de l'espèce de levure utilisée. Ainsi, les LI sont des solvants prometteurs pour le prétraitement de la (ligno)cellulose à basses températures permettant une hausse des rendements d'hydrolyse enzymatique et de production éthanolique.

**Mots clés :** Biomasse lignocellulosique, bioéthanol de deuxième génération, levures, prétraitement, liquides ioniques, hydrolyse enzymatique, fermentation éthanolique.

## Abstract

Lignocellulosic biomass (LCB) derived from forest and/or agricultural residues represents a promising and renewable feedstock to produce second generation bioethanol and to handle the depletion of fossil fuels. The bioethanol production process applied in this study starts with an LCB pretreatment using two hydrophilic imidazolium-based ionic liquids (ILs), the 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate [Emim][OAc] and the 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylphosphonate [Emim][MeO(H)PO<sub>2</sub>], followed by an enzymatic hydrolysis by cellulases from *Trichoderma reesei* and xylanases from *Trichoderma longibrachiatum* and a microbial-based ethanolic fermentation tested on four yeast species : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces shehatae* and *Scheffersomyces stipitis*. Two real LCBs were studied : the white willow (forest residue) and the destarched wheat bran (agricultural residue). The results showed that IL-pretreatment of LCBs at 35°C improves the polysaccharides enzymatic digestibility (up to +56.7% for glucose yields and up to +31.1% for xylose yields) in comparison with the control without pretreatment. In addition, the performance of ethanolic fermentation processes is enhanced by a factor of 1.3 to 4.6 depending on the substrate studied and the yeast species used. Thus, ILs are promising solvents for the pretreatment of (ligno)cellulose at low temperatures allowing an improvement in enzymatic hydrolysis and ethanolic production yields.

**Keywords :** Lignocellulosic biomass, second generation bioethanol, yeasts, pretreatment, ionic liquids, enzymatic hydrolysis, ethanolic fermentation.