



MOOC AGRORESSOURCES ET AGRO-INDUSTRIES DURABLES

SEMAINE 4 - Génie enzymatique

Auteur : Xavier CAMELEYRE

Bonjour, je m'appelle Xavier Cameleyre. Nous allons aborder la dégradation ou hydrolyse enzymatique des fractions issues du prétraitement de la biomasse lignocellulosique.

La valorisation optimale de la biomasse passe par l'exploitation de tous ses composants dans une approche intégrée de type bioraffinerie. La viabilité économique d'une bioraffinerie lignocellulosique est donc étroitement dépendante de la manière dont sont valorisées la cellulose, les hémicelluloses et la lignine faisant partie de la biomasse.

Un des verrous majeurs pour l'industrialisation et la valorisation de la biomasse lignocellulosique est l'étape d'hydrolyse enzymatique qui suit l'étape de prétraitement dans les schémas classiques. En effet, le coût élevé est lié à la fois au procédé de production des enzymes et à la quantité excessive d'enzymes nécessaire pour convertir la biomasse.

La dégradation de la cellulose et des hémicelluloses est réalisée par des microorganismes que l'on rencontre soit à l'état libre dans la nature, soit dans l'appareil digestif des animaux supérieurs. La structure variable et l'organisation des hémicelluloses nécessitent l'action concertée de nombreuses enzymes pour atteindre leur dégradation complète.

Même si l'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose est généralement menée de manière conjointe en présence de cocktails enzymatiques, nous aborderons de manière séparée la dégradation enzymatique de ces bio-polymères.

Hydrolyse de la cellulose

L'hydrolyse donc de la cellulose par des enzymes est souvent la voie préconisée pour l'obtention des sucres. La plupart des évaluations économiques sont en faveur de l'hydrolyse enzymatique comparativement à l'hydrolyse chimique. Elle génère peu d'effluents à traiter et peu ou pas de problèmes de corrosion. Elle présente un potentiel d'amélioration beaucoup plus grand que l'hydrolyse chimique qui a fait l'objet de travaux depuis plusieurs dizaines d'années.

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, appelées cellulases, sont majoritairement sécrétées par les champignons (*Trichoderma reesei*). Cependant, aucune enzyme seule n'est capable de dégrader entièrement la cellulose et une hydrolyse complète nécessite l'action synergique de trois types de cellulases :

- les endoglucanases qui coupent aléatoirement les chaînes de cellulose majoritairement au niveau des zones amorphes générant de nouvelles extrémités de



MOOC AGRORESSOURCES ET AGRO-INDUSTRIES DURABLES

chaînes. Elles sont responsables de la diminution du degré de polymérisation et permettent de créer de nouveaux bouts de chaînes pour l'attaque par les cellobiohydrolases.

- les cellobiohydrolases ou exoglucanases qui agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du cellobiose. On peut distinguer deux types de cellobiohydrolases :
 - CBHI qui agit sur les bouts de chaînes réducteurs.
 - CBHII qui agit sur les bouts de chaînes non réducteurs.
- les β -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose et dans une moindre mesure les cellodextrines solubles, en glucose.

Les endoglucanases et les cellobiohydrolases agissent directement sur le substrat solide après adsorption sur celui-ci tandis que les β -glucosidases agissent en milieu homogène sur substrat soluble.

Comme toutes réactions enzymatiques, les principaux inhibiteurs de la réaction sont ses propres produits. Il est démontré depuis longtemps que la réaction est inhibée par le cellobiose.

La β -glucosidase est la dernière famille d'enzymes cellulolytiques présente dans les cocktails enzymatiques issus de champignons tels que *T. reesei*.

Elle hydrolyse le cellobiose et, dans une moindre mesure, les oligomères solubles du glucose. Cette enzyme joue un rôle clé car elle permet de réduire l'inhibition des cellobiohydrolases et des endoglucanases par le cellobiose. Elle a donc le rôle majeur de régulateur de la vitesse d'hydrolyse. Cependant, cette enzyme est toujours présente en très faible quantité dans le sécrétome de *T. reesei* et une solution consiste à compléter le cocktail enzymatique par des sources industrielles de β -glucosidase

Le lot industriel le plus utilisé aujourd'hui est celui produit par une souche industrielle d'*Aspergillus niger*.

Comme la majorité des enzymes, la β -glucosidase est inhibée par le produit la réaction, le glucose, mais le niveau d'inhibition dépend de l'origine de l'enzyme. Ainsi la β -glucosidase d'*A. niger* semble moins sensible à l'inhibition par le glucose que celle de *T. reesei*.

La synergie entre les enzymes est un phénomène essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Elle se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées. On exprime souvent le degré de synergie (DS) comme le ratio de l'activité du mélange d'enzymes sur la somme des activités des enzymes utilisées séparément.

Deux types de synergies ont été mis en évidence dans la littérature :

- la synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases appelée synergie Exo-Endo,
- la synergie entre les deux cellobiohydrolases CBHI et CBHII appelée synergie Exo-Exo.



MOOC AGRORESSOURCES ET AGRO-INDUSTRIES DURABLES

Plusieurs paramètres semblent influencer la synergie à savoir :

- la concentration totale en enzymes : plus la saturation du substrat par les enzymes est importante, plus le degré de synergie est faible.
- l'influence du ratio de chaque enzyme : même si ceci est plus discuté ou controversé,
- les propriétés morphologiques du substrat : l'augmentation de la cristallinité du substrat entraînant l'augmentation de la synergie

Paramètres influençant l'activité des enzymes

Même si l'inhibition par les produits de réaction (glucose et cellobiose) est un phénomène qu'il est important de considérer, la température et le pH sont les deux paramètres principaux influençant l'activité enzymatique.

La température optimale des cellulases est aux alentours de 50°C et le pH optimal proche de 5. Toutefois les enzymes se dénaturent lorsqu'elles sont chauffées au-delà des températures physiologiques, entraînant une perte de leur activité catalytique. Celles de *T. reesei* semblent être stables jusqu'à 50°C, excepté la β -glucosidase qui est stable jusqu'à 60°C. Cette dénaturation thermique est bien entendu accentuée dans le cas de temps prolongé d'exposition.

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est dépendante de la réactivité des enzymes et du substrat. Quels que soient les enzymes et le substrat utilisés, une forte diminution de la vitesse de réaction est observée au cours de la conversion. Plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette diminution et ils sont souvent classés en deux catégories: ceux liés aux enzymes et ceux liés au substrat. Il est cependant très compliqué d'isoler et de quantifier l'impact de chaque facteur.

Influence des facteurs liés aux enzymes

Plusieurs facteurs liés aux enzymes semblent influencer la vitesse d'hydrolyse. Outre le type d'enzymes et la concentration utilisée, la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse peut être due :

- à l'inhibition des enzymes par les produits de réaction
- à la désactivation ou l'adsorption non productive des enzymes

L'inhibition par les produits de réaction est souvent considérée comme un paramètre important. Les enzymes cellulolytiques, principalement les cellobiohydrolases et les endoglucanases, sont connues pour être inhibées par le cellobiose, et dans une moindre mesure, par le glucose. L'effet de l'inhibition par les produits de réaction est largement décrit pour chaque enzyme mais des incertitudes restent à être levées concernant le type d'inhibition (compétitive ou non-compétitive).



MOOC AGRORESSOURCES ET AGRO-INDUSTRIES DURABLES

La dégradation ou l'inactivation des enzymes semblent également être des raisons expliquant la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse durant la conversion.

Il est cependant extrêmement difficile de mesurer l'impact de la désactivation des enzymes sur la vitesse de réaction car ce phénomène est forcément couplé à d'autres, et plus particulièrement à l'inhibition des enzymes par les produits. Certains auteurs pensent que l'inactivation des enzymes se fait par une adsorption non productive des enzymes sur le substrat.

Influence des facteurs liés au substrat

Il a été démontré que les paramètres morphologiques et structuraux avaient une influence sur la vitesse initiale d'hydrolyse et que certains d'entre eux évoluaient au cours de la conversion. Il est suggéré que les parties dites les plus "accessibles" sont hydrolysées en premier, les enzymes délaissant les parties les plus réfractaires.

Il semble que la réactivité intrinsèque du substrat diminue pendant la réaction et ce phénomène pourrait expliquer une partie de la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse pendant la conversion. Cependant, ces observations sont à nuancer car il semblerait que la diminution de la réactivité soit dépendante du type de substrat.

De plus, certaines propriétés morphologiques du substrat sont clairement altérées par l'hydrolyse enzymatique mais il est difficile de corréliser ses évolutions avec un changement de réactivité du substrat.

Ainsi les facteurs susceptibles d'entraîner une diminution de la vitesse d'hydrolyse enzymatique pendant la conversion sont nombreux. La difficulté majeure est liée à la capacité d'isoler chaque phénomène afin de quantifier son impact sur l'hydrolyse. Il est important de noter que les phénomènes responsables de la chute de la vitesse d'hydrolyse sont à la fois liés aux enzymes, et à la fois liés au substrat.

Dégradation des hémicelluloses

Hormis les cellulases, il a été clairement démontré que d'autres enzymes sont aussi importantes pour la transformation efficace de la biomasse en sirops de sucres fermentescibles : les hémicellulases.

Parmi celles-ci l'on peut citer les xylanases, les xylosidases et les arabinofuranosidases qui agissent sur les arabinoxylanes (les hémicelluloses majeurs chez les graminées et le bois de feuillus).

Ces enzymes sont particulièrement utiles lorsqu'il s'agit de l'hydrolyse d'une cellulose préparée par prétraitement alcalin, car comme nous l'avons vu précédemment, l'étape de prétraitement ne permet pas de dépolymériser totalement les hémicelluloses. Par ailleurs, ces enzymes sont particulièrement cruciales lors du traitement des biomasses riches en hémicelluloses telles que certains coproduits agricoles comme le son de blé et les rafles de maïs.



MOOC AGRORESSOURCES ET AGRO-INDUSTRIES DURABLES

Les enzymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses forment un groupe hétérogène constitué par des xylanases, mannanases, galactanases, arabinases....

Le mécanisme d'action de ces enzymes est le même que pour les cellulases avec une action à l'intérieur des chaînes (endoenzyme) et à partir de l'extrémité non réductrice des oligosaccharides libérés.

Les hémicellulases sont typiquement des protéines modulaires avec donc un module catalytique et d'autres modules fonctionnels. Des modules essentiels non catalytiques sont le module de liaison aux carbohydrates (appelé CBM), qui facilite l'arrimage des enzymes aux polysaccharides, et le module dockerine qui assure la liaison du module catalytique via des interactions cohésine-dockerine.

Les modules catalytiques des hémicellulases sont soit des glycoside hydrolases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques, soit des carbohydrate esterases, qui hydrolysent les liaisons esters des groupes latéraux acétate ou acide férulique.

Ces dernières années, la compréhension de la relation structure/fonction des hémicellulases a progressé considérablement à partir des structures cristallines à haute résolution et l'analyse catalytique.

Il est possible ainsi de classifier différentes hémicellulases sur la base du substrat principal :

- Les endo- β -xylanases hydrolysent la liaison β -1,4 dans le squelette des xylanes, conduisant à la formation de xylooligomères.
- Les exo- β -xylosidases sont des glycosidases qui hydrolysent les xylooligomères en unités xylose simples.
- Les endo- β -mannanases hydrolysent les hémicelluloses à base de mannane et libèrent des mannooligomères, qui peuvent être ensuite hydrolysés en mannose par des β -mannosidases.
- Les α -arabinofuranosidases et α -arabinanases hydrolysent les hémicelluloses contenant des groupes arabinofuranosyles.
- Les α -glucuronidases rompent la liaison α -1,2-glycosidique entre l'acide 4-O-méthylglucuronique et des xylooligomères.
- Les acétyl xylane estérases hydrolysent les substitutions acétyles sur les entités xylose.
- Enfin les féruloyl estérases hydrolysent la liaison ester formées entre l'arabinose et l'acide férulique.

Les hémicellulases sont parfois utilisées spécifiquement dans certains domaines d'application.

Ainsi dans les industries d'extraction ces enzymes servent à éliminer le trouble des jus de fruit, ou à augmenter le rendement d'extraction de l'amidon de blé, dans les industries brassicoles.

Les hémicellulases sont aussi employées afin d'améliorer la valeur nutritive des ensilages et augmenter le rendement de production dans le cas de l'alimentation au grain des volailles.



MOOC AGRORESSOURCES ET AGRO-INDUSTRIES DURABLES

Voie d'amélioration

Il existe toujours plusieurs obstacles à l'utilisation à l'échelle industrielle de ces procédés enzymatiques.

Le taux d'hydrolyse diminue très rapidement ce qui exige un temps de traitement très long. La réduction de l'accessibilité à la surface de la cellulose par des contaminants nuit à la réaction. La faible surface spécifique et une cinétique d'hydrolyse plus lente pour la cellulose cristalline sont autant d'obstacles qui rendent l'hydrolyse enzymatique improductive. L'utilisation d'une quantité importante d'enzyme améliore le taux de conversion, mais elle a une conséquence sur le coût du procédé.

Ainsi, pour diminuer le coût des cellulases, différentes stratégies ont déjà été adoptées, dont certaines visent à améliorer l'efficacité intrinsèque de ces enzymes. À forte concentration en glucides, les cellulases de *T. reesei* sont inhibées par leurs produits, le cellobiose et le glucose.

Par conséquent, il est utile soit de modifier ces enzymes par mutagenèse pour lever cette limitation, soit d'éliminer le glucose de façon continue, par exemple en utilisant la technique SSF.

Via la technique de mutagenèse *in vivo* de la souche entière ou celle de la modification *in vitro* des enzymes, des avancées dans ce domaine, et vis-à-vis d'autres aspects, ont été réalisées. Une autre stratégie qui vise à améliorer la performance des cellulases consiste à renforcer leur action synergique.

Comme nous l'avons vu, l'hydrolyse de la cellulose requiert une cascade enzymatique où une bonne coopération entre les différentes enzymes est déterminante pour obtenir des rendements élevés. Or, dans les mélanges cellulolytiques provenant de souches naturelles, cette synergie n'est pas nécessairement optimale. Par conséquent, un effort considérable de recherche a consisté en l'amélioration ou le renforcement de certaines activités. Soit il s'agit d'augmenter l'expression et donc la quantité d'un des composants enzymatiques, soit il s'agit d'ajouter une nouvelle enzyme provenant d'une autre source microbienne.