



**HAL**  
open science

## Biotechnologies et bioprocédés : clé de voute de la chimie verte

Claire Dumon, Luc Fillaudeau, Cédric Y Montanier

► **To cite this version:**

Claire Dumon, Luc Fillaudeau, Cédric Y Montanier. Biotechnologies et bioprocédés : clé de voute de la chimie verte. Dossier chimie verte et industries alimentaires, 2021, pp.20. hal-04153187

**HAL Id: hal-04153187**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04153187>**

Submitted on 6 Jul 2023

**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.

# Biotechnologies et bioprocédés : clé de voute de la chimie verte

Claire DUMON, Luc FILLAUDEAU, Cédric Y. MONTANIER,

Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA,  
31077 Toulouse, France

Des techniques de brassage des anciens égyptiens à la bio-raffinerie de seconde génération, des siècles nous contemplent. Toutefois, les opérations unitaires ne sont pas si éloignées et l'utilisation d'outils biocatalytiques (enzymes et/ou microorganismes) doit permettre à nos sociétés dépendantes du carbone fossile de pouvoir aborder le tournant technologique utilisant du carbone renouvelable et ainsi relever cet **e** imposant défis qui consiste à faire de la chimie verte à partir des plantes.

Mots-clés : Biotechnologie blanche, bioprocédé, opération unitaire, biocatalyse, ingénierie enzymatique

## ABSTRACT

Abstract:

From the brewing techniques of the Ancient Egyptians to the second generation bio-refinery, centuries are ahead of us. However, unitary operations are not so far away and the use of biocatalytic tools (enzymes and/or microorganisms) must allow our societies dependent on fossil carbon to be able to approach the technological turn using renewable carbon and thus to take up this imposing challenge which consists in making green chemistry from plants.

Key words: White biotechnology, bioprocess, unit operation, biocatalysis, enzyme engineering

## I - INTRODUCTION

Les vestiges de ce qui pourrait être défini comme la plus ancienne brasserie de production à grande échelle au monde (-5000 ans av JC) a été mise au jour sur le site archéologique d'Abydos en Egypte en février 2021. A cette époque, un mélange de grains de céréale et d'eau était chauffé dans des grandes bassines de terre cuite et fermentait sous l'action de micro-organismes présents dans la mixture. Le site en question présente huit zones organisées en unités de production pouvant produire plus de 220 hectolitres de bière simultanément. De nos jours, la fabrication de la bière est plus complexe et se décompose en une succession d'opérations unitaires aux conditions opératoires optimisées par rapport au produit recherché. En amont de la fermentation (up-stream), nous trouvons ainsi plusieurs étapes de préparation des céréales comme le maltage, le brassage, la séparation des drèches et l'ébullition du moût. Toutefois, lorsque la fermentation conduit à la production d'alcool pure comme dans le cas des distilleries ou des rumeries, des opérations en aval de la fermentation (down-stream) viennent s'ajouter comme des opérations de séparation solide/liquide, de distillation et de refroidissement. Concernant la fermentation en elle-même, de nombreuses souches de levures ont été développées en lien direct avec les spécificités propres aux brasseries et aux distilleries. Ces microorganismes sélectionnés sont capables de fermenter le glucose présent dans les grains en éthanol grâce aux enzymes qu'ils produisent naturellement. Or, ce n'est qu'à la fin du XIXe siècle que le rôle des enzymes dans ces transformations biochimiques sera mis en évidence par Wilhem Ostwald. Cette

période marque ainsi un tournant dans l'histoire de ce que Károly Ereky nommera en 1919 la «biotechnologie», à savoir la transformation d'un substrat par biocatalyse enzymatique et/ou microbienne. Mais la véritable naissance de la biotechnologie industrielle moderne est généralement située pendant la Seconde Guerre mondiale et concerne le développement de la production à l'échelle industrielle d'antibiotiques comme la pénicilline, produits par culture en réacteur du champignon filamenteux *Penicillium notatum*.

Ce terme biotechnologie couvre de nos jours l'ensemble des applications technologiques des systèmes biologiques, s'appliquant aussi bien au développement d'outils et stratégies biothérapeutiques en médecine qu'à la création de nouvelles variétés végétales pour l'agriculture<sup>2</sup>. Du fait de la nature très générique de ce terme et pour simplifier la communication autour de la biotechnologie, six sous-domaines sont généralement identifiés et codifiés par couleur. Il en va ainsi de la couleur rouge pour la biotechnologie médicale, alors que la couleur bleue fait écho à l'exploitation des ressources marines. De même, le déploiement industriel des outils biotechnologiques pour la production d'aliments, de molécules d'intérêt chimiques et énergétique, et d'autres produits de grande consommation est désigné biotechnologie industrielle ou blanche. De nos jours, les effets du réchauffement climatique, conséquence directe de la dépendance de nos sociétés en carbone fossile, poussent les responsables politiques à adopter des réglementations de plus en plus contraignantes pour les industries, les forçant à développer des procédés de production moins énergivores et plus respectueux de l'environnement. Dans ce contexte, le passage de la production de molécules chimiques dérivées du pétrole à des molécules issues de carbone renouvelable doit répondre aux douze principes de la chimie verte développées à la fin des années 1990, ouvrant ainsi la voie à l'application de solutions innovantes et éco-responsables dont la finalité est aujourd'hui le développement de la bio-économie circulaire. Or, le carbone renouvelable sur Terre provient des plantes et plus précisément des polymères qui composent la paroi des cellules végétales, comme la cellulose. Ces polymères peuvent ainsi être extraits et valorisés principalement par fermentation en une des douze molécules «plateforme» identifiées par l'International Energy Agency Bioenergy en 2004 et ouvre ainsi la voie au développement des bio-raffineries (Tableau 1).

Il s'agit ainsi d'adapter des bioprocédés et des opérations unitaires utilisés dans l'industrie alimentaire comme la brasserie ou la rhumerie, de quitter le cadre très contraint de l'alimentation humaine et animale pour aller vers le développement de la bioraffinerie. Toutefois, alors que le bioéthanol de première génération issu d'amidon de maïs ou de sucre de canne est déjà une réalité, il reste encore de nombreux défis au développement de carburant de seconde génération et de la chimie verte, dont l'origine réside dans la complexité moléculaire des agro-ressources ou des agro-résidus. Le développement des procédés upstream mais également des micro-organismes et des enzymes capables de les déconstruire, dépendants de la diversité des molécules produites, reste un enjeu majeur.

Tableau 1. Classification des molécules plateformes issues des bioraffineries en fonction de la matière premières et des techniques de transformations (d'après Chaturvedi et al., 2020)

Type de bioraffinerie	Matières premières	Techniques de transformation	Produits
Bioraffineries vertes	Biomasse humide: herbes vertes et cultures vertes, telles que la luzerne et le trèfle.	Prétraitement, pressage, fractionnement, séparation, digestion	Acide lactique, acides aminés, éthanol, protéines, biogaz, colorants, pigments.
Bioraffineries de cultures entières	Culture entière (y compris la paille) de céréales telles que le seigle, le blé et le maïs.	Broyage à sec ou humide, conversion biochimique	Gaz de synthèse, sorbitol, glucose amine, éthanol, biogaz, éthylène glycol, propylène glycol, glycérine.
Bioraffineries de matières premières lignocellulosiques	<b>Biomasse riche en lignocellulose: paille, roseau, miscanthus, bois, etc...</b>	Prétraitement, hydrolyse chimique et enzymatique, fermentation, séparation	Énergie, gaz de synthèse, méthanol, acide lévulinique, éthanol, acide acétique, acide lactique, furfural, 5-hydroxyméthyl-furfural (HMF).
Bioraffineries marines	Biomasse aquatique: microalgues et macroalgues	Désintégration cellulaire, extraction et séparation des produits	Protéines pour la pisciculture, aliments diététiques ou de santé, lipides, en particulier acides gras de grande valeur: acide linoléique et acide g-linolénique.

## II - BIOPROCÉDÉS ET OPÉRATIONS UNITAIRES

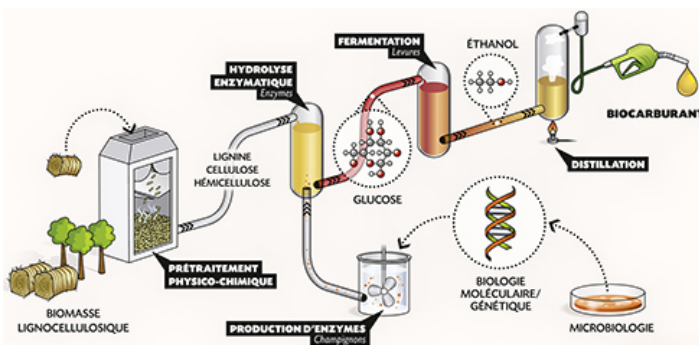
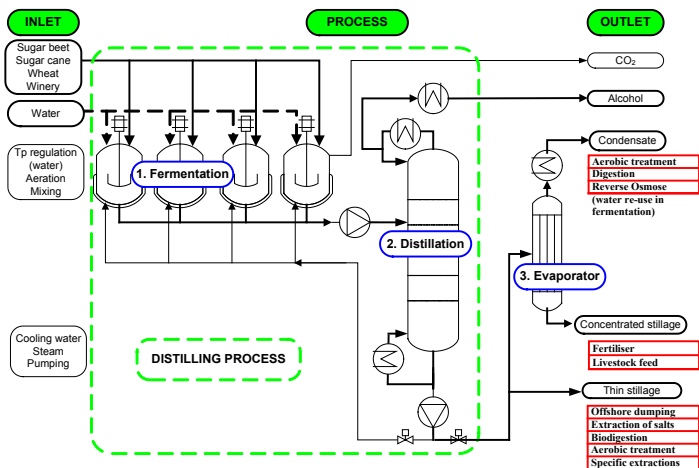
La conception des procédés de bio-raffinage de 1<sup>ère</sup> génération s'est appuyée sur la synthèse, l'analyse, l'association et la conception des procédés agro-industriels traditionnels (raffinerie de sucre, amidonnerie, féculerie, brasserie, rhumerie, distillerie...), un domaine bien étudié depuis plus d'un siècle (Fig.1)<sup>4</sup>. Les procédés agro-alimentaires ont évolué au fil du temps pour identifier les voies de traitement nécessaires à la production des produits souhaités, l'identification des réactions (bio)chimiques impliquées, la sélection et la conception des opérations unitaires, le calcul des utilités (eau, énergie), des déchets, des émissions, etc. Toutefois, ces filières sont sujettes à une réglementation stricte (nouveaux procédés, utilisation des arômes, additifs, enzymes et auxiliaires technologiques) visant à protéger les consommateurs et les animaux et assurer la

sécurité sanitaire des aliments. Considérant la bio-raffinerie de 1<sup>ère</sup> génération, la transformation du maïs en éthanol et des déchets en biogaz est bien étudiée et établies, alors que la plupart des autres voies de transformation de la biomasse sans compétition avec les ressources alimentaires dite de 2<sup>nde</sup> et 3<sup>ème</sup> génération, restent commercialement non compétitives et ouvertes à la recherche et au développement continu<sup>5-7</sup>.

Pour produire des sucres à partir de la biomasse végétale, celle-ci subit un prétraitement physique et/ou thermochimique, éventuellement biologique, afin de réduire la taille de la matière première et d'ouvrir la structure végétale (up-stream). Les parties cellulosiques et hémicellulosiques sont déconstruites par des enzymes et les sucres simples sont ensuite fermentés en produits d'intérêt par des variétés spécifiques de micro-organismes. Actuellement, cette voie biochimique est le procédé le plus utilisé (Karunanithy et al., 2013) qui peut être conceptualisé de manière séparés ou intégrés. Face à la diversité et la complexité structurale et biochimique des substrats, les bioprocédés se déclinent de l'hydrolyse et la fermentation séparées (SHF), l'hydrolyse et la co-fermentation séparées (SHCF), la saccharification et fermentation simultanées (SSF), la saccharification et la co-fermentation simultanées (SSCF) jusqu'aux bioprocédés consolidés (CBP)<sup>9,10</sup>. Les bioprocédés se heurtent à des verrous d'ordre technologique et de connaissance et maîtrise des biocatalyseurs. Ainsi le développement des micro-organismes et des enzymes capables de les déconstruire, mais également des procédés downstream dépendants de la diversité des molécules produites reste un enjeu majeur.

L'objectif des procédés technologiques de bio-raffinage est de déstructurer, dépolymériser et de désoxygéner la biomasse afin de la convertir en produits de valeur. Souvent, plusieurs procédés technologiques doivent être appliqués en parallèle, ou successivement. Ces procédés sont également appelés fractionnement de la biomasse/de la matière première, car ils garantissent que les glucides, les sucres, les lipides, etc. peuvent être mis à disposition pour une biotransformation ultérieure. De manière générale, ces procédés peuvent être divisés en cinq catégories : les procédés thermochimiques, hydrothermiques, biochimiques, mécaniques/physiques et chimiques<sup>5</sup>. A cette fin, la bio-raffinerie offre des opportunités d'innovation et d'exploration d'opérations unitaires seules ou associées, conventionnelles ou alternatives. Les techniques de fragmentation et d'extraction y présentent un intérêt évident: nano-broyage, extrusion-réactive, extraction assistée par micro-onde ou ultrason, fluides supercritiques (CO<sub>2</sub>, eau), prétraitement par solvant sous pression, par organosolv, par liquide ionique, par solvant eutectique, par solutions acide ou alcaline, par eau sous pression ou explosion à la vapeur<sup>11</sup>. De même, l'intensification des procédés et la conduite du prétraitement en conditions concentrés (haute teneur en matière sèche) conduit à la conception de réacteurs avec des design et des modes de fonctionnement innovants<sup>12</sup> pour assurer le mélange, les transferts et l'élimination d'inhibiteurs. Enfin, le bon déroulement des opérations peut être contrôlé avec l'utilisation d'auxiliaires technologiques tels que les adjuvants de filtration, les antimousses, les agents décolorants ou les biocides, présentant des contraintes d'utilisation moins drastique qu'en agro-alimentaire. Néanmoins le niveau de maturité technologique (TRL) de ces différentes opérations unitaires est très hétérogène et parfois non transposable à l'échelle agro-industrielle.

Figure 1: Comparaison des procédés et des opérations unitaires en distillerie et en bio-raffinerie de 1ère génération



III - CATALYSE ENZYMATIQUE

Les plantes ont colonisé la terre ferme il y a 475 millions d'années et depuis leur paroi cellulaire n'a cessé de se complexifier, autant en structure qu'en composition, avec la diversité des espèces. Elle se compose aujourd'hui d'une matrice de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de lignine. Toutefois, cette paroi végétale protectrice demeure récalcitrante à la dégradation mais constitue une source de carbone vitale pour les micro-organismes lignocellulolytiques. Ces derniers ont ainsi développés des stratégies de dégradations variées dont la base est la production d'un large répertoire d'enzymes fonctionnant en synergie<sup>13</sup>. Par exemple, l'hydrolyse de la cellulose nécessite l'action d'endoglucanases qui, rompant la liaison glycosidique entre deux glucoses composant la cellulose, créent ainsi des points d'action pour les cellobiohydrolases réduisant des oligomères en cellobiose, eux-mêmes hydrolysés en glucose par des  $\beta$ -glucosidases. Les «Lytic Polysaccharides Monooxygénases» (LPMO) dont le mécanisme a été découvert en 2010 catalysent l'hydrolyse de la chaîne de cellulose par clivage oxydatif, favorisant alors la dégradation de la cellulose par des cellobiohydrolases et autres  $\beta$ -glucosidases<sup>14</sup>. De nos jours, cette synergie enzymatique est mise en œuvre en bio-raffinerie après le prétraitement de la biomasse végétale, au cours de l'étape de liquéfaction et saccharification. Cette étape est principalement réalisée à l'aide de cocktails enzymatiques fongiques produits industriellement. La souche de référence productrice de cocktails cellulolytiques est *Trichoderma reesei*<sup>15</sup>. Découvert durant la guerre du Pacifique (1944) parce qu'il dégradait les tentes en coton de l'armée américaine, ce champignon produit en grande quantité un large ensemble d'enzymes cellulolytiques et accessoires permettant d'hydrolyser la cellulose, avec cependant une efficacité moindre sur les hémicelluloses. Ces dernières, plus

complexes que la cellulose, peuvent représenter jusqu'à 35 % de la masse sèche d'une graminée. L'hydrolyse de ce polysaccharide nécessite la mise en œuvre d'activités enzymatiques spécifiques telles que des xylanases et xylosidases qui hydrolysent la chaîne principale de xylose, des arabinofuranosidases, des feruloyl-esterase, glucuronidases et acetyl-esterases qui hydrolysent les substituants de la chaîne principale (Fig.2)<sup>16</sup>. Ces enzymes augmentent les rendements de saccharification en rendant la cellulose accessible, mais aussi parce que la présence des hémicelluloses peut générer des inhibiteurs de cellulases et des activités microbiennes<sup>17</sup>. Ainsi, les premiers cocktails cellulolytiques ont évolués vers des cocktails hémicellulolytiques. Toutefois, il reste encore du chemin à parcourir pour déconstruire de manière optimale la biomasse végétale, notamment la lignine, qui nécessite des enzymes encore relativement peu étudiées comme les laccases, peroxidases, et les estérases.

L'amélioration de ces cocktails enzymatiques passe aussi par le développement des technologies dites «omics» afin de cribler la biodiversité existante à haut débit ou bien par ingénierie enzymatique afin d'adapter les enzymes aux conditions opératoires (pH, température, pression, salinité ...) en appliquant des approches issues notamment de l'intelligence artificielle. Néanmoins, la nature reste une source d'inspiration quant à la mise en œuvre de cette synergie enzymatique. En effet, les bactéries anaérobiques du genre *clostridium* ont développé une structure protéique extra membranaire, le cellulosome, pouvant accommoder plusieurs dizaines d'enzymes hydrolytiques, particulièrement efficace pour dégrader la cellulose<sup>18</sup>. Ainsi, la proximité spatiale de toutes ces enzymes joue un rôle important mais son rôle sur la synergie enzymatique reste encore peu étudié. Un autre exemple est donné par les bactéries du genre *bacteroides* qui constituent une partie importante de la flore intestinale chez l'homme, dans le rumen des bovins ou dans le tube digestif des insectes (termites). Ces bactéries possèdent des locus de gènes organisés en Polysaccharide Utilization Loci (PUL) codant pour toutes les enzymes nécessaires à la dégradation d'un polysaccharide donné telle que la pectine qui nécessite l'intervention de pas moins de 21 enzymes différentes<sup>19</sup>. Au regard du faible coût du séquençage génétique ou bien de la synthèse de gènes, ces systèmes organisés constituent donc une source potentielle de nouvelles enzymes. Néanmoins, il reste une question centrale portant sur la compréhension de l'activité enzymatique en présence de son substrat naturel et insoluble. L'enzyme est mise en œuvre dans un milieu évolutif hétérogène pouvant se comporter comme une suspension diluée, semi-diluée ou concentrée. Il réside ici un certain nombre de questions scientifiques relevant des procédés et de leur nécessaire transposition industrielle.

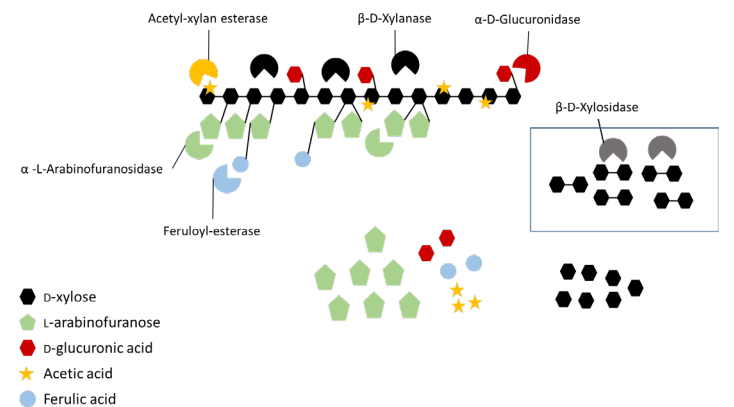


Figure 2: Enzymes impliquées dans la dégradation d'un arabinoxylane, hémicellulose majoritaire chez les graminées. L'arabinoxylane est composé d'une chaîne principale de xylose sur laquelle de nombreux oses sont branchés.



## IV – CONCLUSION

L'utilisation du carbone renouvelable et le développement des bio-raffineries (biotechnologie industrielle) depuis ces 40 dernières années a indéniablement bénéficié des acquis issus de l'industrie agro-alimentaire mais doit être mis en miroir de l'utilisation du carbone fossile et de l'expansion de la pétrochimie depuis 150 ans. Les biotechnologies et les bioprocédés sont un formidable levier vers une chimie verte et le moyen de réduire notre impact environnemental. Ils le sont d'autant plus que nos déchets ménagers ou ceux issus de l'industrie représentent une source considérable de molécules organiques dont la valorisation reste encore à l'état embryonnaire. Sous l'angle des procédés, la bio-raffinerie de 2<sup>nde</sup> et 3<sup>ème</sup> génération nécessite d'innover, d'explorer et de coupler des opérations unitaires au-delà d'un référentiel historique agro-industriel. De plus, les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique ont conduit ces dernières années à une meilleure compréhension des mécanismes du vivant, permettant ainsi l'émergence d'une nouvelle biologie, la biologie de synthèse. De quoi modifier profondément les approches futures en termes d'opération unitaire au sein de bioprocédés.

## RÉFÉRENCES

1. Doyon, W. The Thirstiest Kings Who Ever Lived. *Abydos Archaeology* (2021). Available at: <https://abydos.org/blog/2021/2/14/the-thirstiest-kings-who-ever-lived>.
2. United Nations. *Convention on biological diversity*. (1992).
3. Anastas, P. T. & Warner, J. *Green chemistry theory and practice*. (1998).
4. Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, Brulé G., *Science des aliments : Biochimie, Microbiologie, Procédé, Produits. Vol 2 : Technologies des produits alimentaires*. Ed. Tech & Doc Lavoisier. (2006).
5. Chaturvedi, Tanmay, A Torres, Ana I., A Stephanopoulos, George, A Thomsen, Mette Hedegaard, A Schmidt, Jens Ejbye. « *Developing Process Designs for Biorefineries—Definitions, Categories, and Unit OperationEnergies* », *Energies*, 2020, 13(6), 1493; <https://doi.org/10.3390/en13061493>
6. Humbird, D.; Davis, R.; Tao, L.; Kinchin, C.; Hsu, D.; Aden, A. *Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover; National Renewable Energy Lab.: Golden, CO, USA*, 2011. <https://www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf>
7. Sim, R., Taylor, M., Saddler, J.N., Mabee, W. 2008. *From 1st to 2nd generation biofuel technologies - An overview of current industry and R&D activities*. OECD/IEA Bioenergy (<http://task39.sites.olt.ubc.ca/files/2013/05/From-1st-to-2nd-generation-biofuel-technologies.pdf>)
8. Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. & Gibbons, W. R. Effect of Extruder Screw Speed, Temperature, and Enzyme Levels on Sugar Recovery from Different Biomasses. *ISRN Biotechnol.* **2013**, 1–13 (2013).
9. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 506–577 (2002).
10. Jäger, G. & Büchs, J. Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *Biotechnol. J.* **7**, 1122–1136 (2012).
11. Tien Cuong Nguyen. In-situ and ex-situ multi-scale physical metrologies to investigate the destructuration mechanisms of lignocellulosic matrices and release kinetics of fermentescible cellulosic carbon. PhD thesis (SA Toulouse, 2014).
12. Tuan, L. Investigation of physical mechanisms during deconstruction of pretreated lignocellulosic matrix and its ability to liberate a fermentable carbon substrate in a bio-process. PhD thesis (Université Paul Sabatier (Toulouse, France) and Hanoi University of Science and Technology (Hanoi, Vietnam), 2017). <http://www.theses.fr/2017TOU30133>
13. Gilbert, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiol.* **153**, 444–455 (2010).
14. Beeson, W. T., Vu, V. V., Span, E. A., Phillips, C. M. & Marletta, M. A. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 923–946 (2015).
15. Bischof, R. H., Ramoni, J. & Seiboth, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* **15**, 106 (2016).
16. Dumon, C., Song, L., Bozonnet, S., Fauré, R. & O'Donohue, M. J. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochem.* **47**, 346–357 (2012).
17. Qing, Q., Yang, B. & Wyman, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour. Technol.* **101**, 9624–9630 (2010).
18. Zhivin, O. *et al.* Unique organization and unprecedented diversity of the Bacteroides (Pseudobacteroides) cellulosolvens cellulosome system. *Biotechnol. Biofuels* **10**, 211 (2017).
19. Luis, A. S. *et al.* Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides. *Nat. Microbiol.* **3**, 210–219 (2018).