

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **31 janvier 2024**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame CACHAFEIRO REQUIA Laura**

Titre de la thèse : : « *Etude de la perte d'activité des cellulases durant l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique* »



Résumé

Le bioéthanol obtenu par voie biologique à partir d'une ressource lignocellulosique est une alternative viable aux carburants pétroliers et aux agrocarburants. L'hydrolyse enzymatique de la cellulose étant l'étape cinétiquement la plus limitante du procédé, il est important de comprendre de façon approfondie les mécanismes réactionnels mis en jeu. Plusieurs études cinétiques réalisées par IFP Energies nouvelles (IFPEN) dans des travaux de thèse antérieurs ont permis l'obtention d'un modèle mécanistique optimisé pour des temps d'hydrolyse courts. Cependant, lors de ces études, une perte d'activité globale du cocktail enzymatique (de l'ordre de 50 % par jour) avait été observée sans que le phénomène sous-jacent n'ait été ni identifié, ni clairement explicité. L'identification des phénomènes à l'origine de la perte d'activité observée est donc indispensable pour poursuivre l'optimisation du procédé. C'est pourquoi, l'objectif principal de la présente thèse a consisté à développer des méthodologies expérimentales permettant d'isoler les phénomènes potentiels et de quantifier leur impact relatif, afin d'obtenir une meilleure prédictibilité des modèles mécanistiques sur des temps longs. Trois phénomènes responsables d'une perte d'activité lors de l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques ont été identifiés durant cette thèse et ont fait l'objet d'études plus spécifiques : la perte d'activité liée à l'interface air-liquide, la perte d'activité liée aux interactions cellulases/lignine et la perte d'activité liée aux interactions cellulases/cellulose.

Lors de la thèse, il a été montré que la perte d'activité enzymatique, due à la présence d'une interface air-liquide, pouvait s'avérer importante et atteindre des valeurs jusqu'à 40 % dans certaines conditions d'agitation et de concentration en enzymes. Le phénomène a été expliqué par un migration des cellulases à la surface air-liquide suivi d'une désactivation, voire d'une précipitation d'une partie de ces dernières. Un modèle phénoménologique a ensuite été développé pour prédire les pertes d'activité liées à la présence de cette interface air-liquide.

Dans un second temps, la thèse a cherché à quantifier la perte d'activité causée par l'adsorption des cellulases sur la lignine en considérant à la fois l'évolution de la surface accessible aux enzymes au cours de l'hydrolyse enzymatique, l'évolution de la composition de cette surface en termes de cellulose et de lignine et les équilibres d'adsorption entre cellulases et lignine d'une part, et cellulases et cellulose d'autre part. Les isothermes d'adsorption et les surfaces spécifiques BET ont été déterminés expérimentalement pour différents supports lignocellulosiques (cellulose pure, lignine pure, substrats partiellement hydrolysés), ce qui a permis de simuler, a posteriori, la distribution des cellulases sur les surfaces cellulosiques et ligneuses durant l'hydrolyse enzymatique et d'en déduire la perte d'enzymes par adsorption sur la lignine.

Finalement, la perte d'activité enzymatique liée à l'évolution même de l'état de surface de la cellulose au cours de l'hydrolyse enzymatique a également été étudiée. A partir des données d'adsorption de différents substrats de cellulose Avicel partiellement hydrolysés couplées aux résultats de réactivité, il a été possible de montrer qu'une partie du ralentissement de la cinétique d'hydrolyse pouvait aussi être expliquée par un changement d'état de surface de la cellulose durant l'hydrolyse.

Ce travail de thèse a permis de montrer que la compréhension des mécanismes impliqués dans la perte d'activité des cellulases est un enjeu très important pour mieux appréhender l'hydrolyse enzymatique dans son ensemble et trouver des solutions pour en améliorer l'efficacité. L'intégration de ces phénomènes dans les modèles mécanistiques d'hydrolyse comme celui disponible à IFPEN fera l'objet de futurs développements pour poursuivre le développement d'un simulateur robuste et prédictif sur des temps longs.