HAL
open science

Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique

Maarouf Abdou Alio

To cite this version:

Maarouf Abdou Alio. Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique. Génie des procédés. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT : 2020CLFAC061 . tel-03218925

HAL Id: tel-03218925

https://theses.hal.science/tel-03218925

Submitted on 6 May 2021

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.

Université Clermont Auvergne

École Doctorale

Sciences pour l'Ingénieur de Clermont-Ferrand

THÈSE

présentée par

Maarouf ABDOU ALIO

en vue d'obtenir le grade de

Docteur d'Université

(Spécialité : Génie des Procédés)

Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique

Soutenance publiquement le 6 Octobre 2020 devant le jury :

M. Claude-Gilles DUSSAP	Professeur des universités, Université Clermont Auvergne	Président
Mme Carole MOLINA JOUVE	Professeur des universités, INSA Toulouse	Rapporteur
M. Nicolas BROSSE	Professeur des universités, Université de Lorraine	Rapporteur
Mme Séverine LOUESDON	Ingénieure de recherche, IFPEN Solaize	Examinatrice
M. Christophe VIAL	Professeur des universités, Université Clermont Auvergne	Directeur de thèse
Mme Agnès PONS	Maître de conférences, Université Clermont Auvergne	Co-encadrante
M Alain MARCATI	Maître de conférences, Sigma Clermont	Invité

Axe Génie des Procédés Énergétique et Biosystèmes (GePEB)

Institut Pascal - UMR 6602 CNRS/UCA/SIGMA Clermont

Résumé

Dans un contexte de transition énergétique et de lutte contre le dérèglement climatique, la production de bioéthanol de 2ème génération est reconnue comme une voie prometteuse pour réduire notre dépendance aux combustibles fossiles.
Ce travail porte sur l'étude de la faisabilité de la production de bioéthanol de 2ème génération à partir d'un substrat végétal de type « déchet bois », constitué de sciure récupérée auprès d'une scierie locale. Cette sciure est un mélange de quatre espèces de bois de types résineux, représentatives des essences locales. L'analyse chimique de ce déchet a montré qu'il contient environ 70 % (g/g) de source potentielle de sucres sous forme de cellulose et d'hémicelluloses exploitables pour la production d'éthanol de 2ème génération par voie biochimique qui fait intervenir trois étapes clés : une étape de prétraitement, une d'hydrolyse enzymatique ou chimique, enfin, une étape de fermentation.
L'étape de prétraitement choisie dans ce travail repose sur une méthode Organosolv avec chauffage par micro-ondes. Ce procédé utilise un solvant organique pur ou dilué, additionné d'un catalyseur pour éliminer la lignine tout en favorisant la récupération de la cellulose et des hémicelluloses et en limitant la formation d'inhibiteurs. La lignine, coproduit du fractionnement, peut être valorisée par ailleurs. Des paramètres tels que la concentration en acide sulfurique (H_2SO_4) en qualité de catalyseur, le rapport éthanol/eau dans le solvant d'extraction, la température et la pression de traitement appliquées ont été étudiés pour optimiser le fractionnement du bois, le rendement et la pureté de la cellulose, la récupération de la lignine et l'absence de formation d'inhibiteurs. Pour le prétraitement, les conditions optimales qui ont été obtenues expérimentalement sur la sciure sont les suivantes : un rapport éthanol/eau de 60/40 avec 0,25 % de H_2SO_4 pour une extraction d'une heure à 175 °C. Ces conditions ont permis d'éliminer 50 % de la lignine tout en préservant 82 ± 3 % de la cellulose initiale avec une pureté de 71 ± 3 %. Ensuite, l'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité a été conduite dans des conditions optimales par un cocktail d'enzymes Cellic® Ctec2, (Novozymes, Danemark) à 50 °C et sous agitation (180 trs./min), ce qui a permis d'atteindre un taux de conversion de la cellulose en glucose de 80 % après 12 jours. Enfin, après enrichissement de l'hydrolysat obtenu, la fermentation de celui-ci par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* a conduit à l'obtention d'un rendement de fermentation alcoolique proche de 80 % du rendement théorique, ce qui semble cohérent avec l'absence d'inhibiteurs observée durant les différentes étapes.
Les simulations de procédé à l'échelle de la bioraffinerie ont montré que 70 088 tonnes/an de

biomasse humide pouvaient être converties en 11 400 tonnes/an d'éthanol en minimisant les besoins en eau et en éthanol (respectivement 4,8 litres d'eau par litre d'éthanol et 99 % de taux de récupération de l'éthanol), au prix de besoins plus élevés en énergie (respectivement 10,9 and 8,6 kWh/L d'éthanol pour les utilités chaudes et froides) que pour les prétraitements en phase aqueuse.

Abstract

In a context of energy transition and the fight against climate change, 2nd generation bioethanol production is recognized as a promising way to reduce our dependence on fossil fuels.
The objective of this study is to analyze the feasibility of 2nd generation bioethanol production from a "wood waste" type of wood substrate, consisting of sawdust obtained from a local sawmill. This sawdust is a mixture of four types of softwood species, representative of local species. Chemical analysis of this waste has shown that it contains approximately 70% (g/g) of potential sugar source in the form of cellulose and hemicelluloses exploitable for the production of 2nd generation ethanol by biochemical route, which involves three key stages : a pretreatment stage, an enzymatic or chemical hydrolysis, and finally a fermentation stage.
The pretreatment step selected in this work is based on an Organosolv method. This process uses a pure or diluted organic solvent, added with a catalyst to remove lignin while promoting the recovery of cellulose and hemicelluloses and limiting the formation of inhibitors. Lignin as a co-product of fractionation can be valued elsewhere. Parameters such as the concentration of sulfuric acid (H_2SO_4) as a catalyst, the ethanol/water ratio in the extraction solvent, the treatment temperature, and the applied pressure were studied to optimize the fractionation of the wood, the yield and the purity of the cellulose, the recovery of the lignin and the absence of formation of inhibitors. For the pretreatment, the optimal conditions obtained experimentally on sawdust are as follows : an ethanol/ water ratio of 60/40 with 0.25% H_2SO_4 for one hour extraction at 175 °C. These conditions made it possible to eliminate 50% of the lignin while preserving 82 ± 3% of the initial cellulose with a purity of 71 ± 3%. Next, the enzymatic hydrolysis of the pretreated substrate under the optimal conditions by an enzyme cocktail (Cellic® Ctec2, Novozymes, Denmark) at 50 °C with shaking (180 rpm) achieved a conversion of cellulose to glucose of 80% after 12 days. Finally, fermentation of the glucosidic hydrolyzate by a strain of *Saccharomyces cerevisiae* led to obtaining an alcoholic fermentation yield close to 80% of the theoretical yield, which seems consistent with the absence of inhibiting compounds observed during the fermentation step.
Process simulations at the biorefinery scale showed that que 70,088 tons/year of wet biomass could be converted into 11,400 tons/year of ethanol, enhancing water and ethanol savings (4.8 L water per L ethanol, and 99 % ethanol recovery, respectively), at the expense of higher energy requitements (10.9 and 8.6 kWh/L ethanol for hot and cold utilities, respectively) than in pretreatments in aqueous phase.

Préface

Cette thèse regroupe les recherches effectuées dans le cadre d'un projet de doctorat mené au sein de l'axe Génie des Procédés Énergétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand (France), du 1er mars 2017 au 29 février 2020. Le professeur Christophe Vial en était le directeur ; le docteur Agnès Pons en était co-encadrante. La présente thèse a été co-financée par les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER) pour la Science et la Technologie et par la région Auvergne-Rhône-Alpes. La thèse est organisée en deux parties : la première met en contexte les résultats de ce doctorat dans une revue introductive ; la deuxième partie comprend les articles énumérés ci-dessous.

Liste de publications scientifiques

Abdou Alio, M., Tugui, O.-C., Rusu, L., Pons, A. and Vial, C. (2020). Hydrolysis and fermentation steps of a pretreated sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery, *Bioresource Technology* **310** : 123412.

Alio, M. A., Tugui, O.-C., Vial, C. and Pons, A. (2019). Microwave-assisted Organosolv pretreatment of a sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery, *Bioresource Technology* **276** : 170–176.

Tribot, A., Amer, G., Abdou Alio, M., de Baynast, H., Delattre, C., Pons, A., Mathias, J.-D., Callois, J.-M., Vial, C., Michaud, P. and Dussap, C.-G. (2019). Wood-lignin : Supply, extraction processes and use as bio-based material, *European Polymer Journal* **112** : 228–240.

Liste des communications Orales dans des congrès internationaux

M. ABDOU ALIO, Ch. VIAL, A. PONS, Organosolv pretreatment for bioethanol production in a wood biorefinery using sawmill mixed feedstocks, 2nd International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts et Environmental Sustainability BIORESTEC (Melia Sitges, Espagne, 16-19 septembre 2018).

Liste des communications orales dans des congrès nationaux

M. ABDOU ALIO, Ch. VIAL and A. PONS, Valorisation d'une biomasse lignocellulosique : production d'éthanol de seconde génération, 7ème Congrès Français de Génie des Procédés (Nantes, France, 15-17 octobre 2019).

M. ABDOU ALIO, Ch. VIAL and A. PONS, Valorisation d'une biomasse lignocellulosique locale : production d'éthanol de seconde génération, Comité de Développement du Génie des Procédés en Auvergne-Rhône-Alpes (Lyon, France, 21 Novembre 2019)

M. ABDOU ALIO, Ch. VIAL and A. PONS, Analyse technico-économique des prétraitements par solvants de la biomasse dans une bioraffinerie lignocellulosique (BLC) de multi-ressources, Comité de Développement du Génie des Procédés en Auvergne-Rhône-Alpes (Chambéry, France, 16 Novembre 2017).

Liste des communications par affiche dans des congrès internationaux

M. ABDOU ALIO, O. TUGUI, A. PONS, L. RUSU, Ch. VIAL, Prétraitement par solvant de connexes de scierie en vue de la production de bioéthanol dans une bioraffinerie multi-ressources, 10ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée COFrRoCA 2018 (Bacău, Roumanie, 27-29 Juin 2018).

M. ABDOU ALIO, O.C. TUGUI, L. RUSU, A. PONS, C. VIAL, Lignocellulosic wastes as biomass feedstocks for second-generation ethanol production, 11th International Conference of Applied Sciences CISA 2019 (Bacău, Roumanie, 22-24 juin 2019).

Vulgarisation scientifique (Ma thèse en 180 seconde Edition 2018)

M. ABDOU ALIO, concours régional de "Ma thèse en 180 secondes" de l'Université Clermont Auvergne, Édition 2018

« I dedicated this work to my entire family specially to my parents to whom I owe so much that can never be repaid. »

Remerciements

Ce travail symbolise à la fois la fin de mon cursus universitaire à l'UCA, mais également le début d'une future carrière. C'est pour moi la fin d'une mue personnelle riche en événements, en rencontres, une véritable période de construction intérieure.

Je veux exprimer ici l'admiration que je porte à Christophe VIAL et Agnès PONS, qui ont été ma source d'inspiration durant ces quelques années, tant au niveau scientifique qu'humain. Grâce à eux, j'aperçois enfin de la lumière...

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail : Nicolas BROSSE et Carole MOLINA JOUVE pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour m'avoir fourni une multitude de pistes de recherche pour les prochaines années ; Séverine LOUESDON pour avoir accepté d'examiner cette thèse ; Alain MARCATI pour avoir accepté mon invitation à participer à ce jury ; et enfin Claude-Gilles DUSSAP pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

J'exprime également ma reconnaissance à

Table des matières

Table des figures **xv**

Liste des tableaux **xviii**

Introduction générale **1**

Bibliographie 5

I Revue Bibliographique **6**

I.1 Dérèglement climatique et concept de transition énergétique 9

I.2 Le secteur des transports : un géant, consommateur d'énergie et émetteur de gaz à effet de serre 10

I.3 Les biocarburants 12

I.4 Bioéthanol 13

I.4.1 Coûts de production du bioéthanol en fonction du procédé 15

I.4.2 Principaux modes de consommation du bioéthanol 17

I.4.2.1 Consommation par l'industrie 17

I.4.2.2 Consommation pour la mobilité 17

I.5 Principaux modes de production d'éthanol 18

I.5.1 Éthanol non renouvelable : Éthanol synthétique 19

I.5.2 Éthanol renouvelable : 1ère génération 19

I.5.3 Éthanol renouvelable : 2ème génération 20

I.6 La biomasse lignocellulosique, matière première pour le bioéthanol 22

I.6.1 Structure de la biomasse lignocellulosique 22

I.6.2 Cellulose 23

I.6.3 Hémicelluloses 24

I.6.4 Lignine 24

I.6.5 Les extractibles 25

I.7 Prétraitement de la biomasse lignocellulosique 25

I.7.1 Prétraitement physique : comminution 27

I.7.2 Prétraitement biologique 28

I.7.3 Prétraitement physico-chimique 29

I.7.3.1 Prétraitement à la vapeur (PV) 29

I.7.3.2 Explosion à l'ammoniac (AFEX) 30
I.7.3.3 Prétraitement par voie hydrothermale 30
I.7.4 Prétraitement chimique 31
I.7.4.1 Prétraitement à acide dilué 31
I.7.4.2 Prétraitement à la chaux et prétraitement par oxydation humide 32
I.7.4.3 Prétraitement à l'explosion au dioxyde de carbone (CO_2) 32
I.7.4.4 Prétraitement aux liquides ioniques 33
I.7.4.5 Prétraitement Organosolv : généralités 33
I.8 Composés toxiques générés pendant le prétraitement de la BLC 36
I.8.1 Les furanes 37
I.8.2 Les acides carboxyliques 38
I.8.3 Les composés phénoliques 38
I.9 Méthodes d'hydrolyse décrites dans la littérature 39
I.9.1 Hydrolyse chimique 39
I.9.2 Hydrolyse enzymatique 40
I.9.3 Facteurs limitants de l'hydrolyse enzymatique 43
I.9.3.1 Facteurs liés aux conditions opératoires, température, pH et agitation 43
I.9.3.2 Effet du séchage du substrat 44
I.9.3.3 Charge d'enzymes et de substrats 44
I.9.3.4 Effet de la concentration en eau 45
I.9.3.5 Effet des inhibiteurs 45
I.10 Fermentation éthanolique 46
I.10.1 Généralités 46
I.10.2 Facteurs d'influence de la fermentation 47
I.10.2.1 Effet de la température 47
I.10.2.2 Effet de la concentration en sucres 48
I.10.2.3 Effet du pH 48
I.10.2.4 Effet de la durée de fermentation 48
I.10.2.5 Effet de l'agitation 48
I.10.2.6 Effet de la concentration de l'inoculum 49
I.11 Concept de bioraffinerie 49
I.12 Stratégie de choix de solvant du procédé Organosolv 50
I.13 Objectifs spécifiques de ce travail de doctorat 55
Bibliographie 55

II Matériels et Méthodes 73
II.1 Matière première : sciures de bois 76
II.2 Caractérisation physico-chimique de la biomasse lignocellulosique (BLC) 77
II.2.1 Détermination du taux d'humidité 78

II.2.2 Séchage de la matière première 78
II.2.3 Prétraitement mécanique : tamisage 78
II.2.4 Dosage des extractibles 79
II.2.5 Dosage du taux de cendres 79
II.2.6 Séparation de l'holocellulose par délignification 80
II.2.7 Dosage de l'α-cellulose 81
II.2.8 Dosage de l'hémicellulose 82
II.2.9 Dosage de la lignine de Klason ou lignine insoluble 82
II.2.10 Dosage de la lignine soluble dans l'acide LSA 83
II.3 Prétraitement Organosolv 84
II.3.1 Réacteur de prétraitement : Monowave 450 84
II.3.2 Mise en œuvre du prétraitement Organosolv 85
II.4 Post-traitements à la cuisson Organosolv 86
II.4.1 Dosages chimiques sur le résidu solide (pâte) 87
II.4.2 Dosage des produits de dégradation : inhibiteurs 88
II.4.3 Précipitation de la lignine Organosolv 88
II.5 Hydrolyse enzymatique 89
II.5.1 Substrats 89
II.5.2 Tampon 89
II.5.3 Cocktail enzymatique 89
II.5.3.1 Mesure de l'activité cellulase 90
II.5.3.2 Dosage des protéines 90
II.5.4 Conditions opératoires de conduite d'hydrolyse 90
II.5.5 Suivi d'hydrolyse 91
II.5.5.1 Dosage des sucres et composés acides par HPLC 91
II.5.5.2 Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS 92
II.6 Fermentation alcoolique : production de bioéthanol 92
II.6.1 Souche de *Saccharomyces cerevisiae* 92
II.6.2 Milieux de culture 93
II.6.3 Matériel de culture et conditions 93
II.6.4 Suivi de fermentation 93
Bibliographie 94

III Prétraitement Organosolv de la matière Lignocellulosique 97
III.1 Introduction 99
III.2 Materials and methods 101
III.2.1 Materials : feedstocks and reagents 101
III.2.2 Feedstock chemical characterization 101
III.2.3 Organosolv pretreatment 102
III.3 Results and discussion 104

III.3.1 Chemical composition of the sawmill mixed feedstocks 104
III.3.2 Effect of sulfuric acid and temperature on the Organosolv pretreatment . 104
III.3.2.1 Effect on cellulose yield and purity 105
III.3.2.2 Effect on the Organosolv lignin recovery 108
III.3.2.3 Effect on inhibitor formation 110
III.3.3 Effect of ethanol-water ratio on the Organosolv pretreatment 110
III.3.3.1 Effect on cellulose yield and purity 110
III.3.3.2 Effect on the Organosolv lignin recovery 111
III.3.3.3 Effect on inhibitor formation 112
III.3.4 Comparison with conventional Organosolv pretreatment 112
III.4 Conclusion 114
III.5 Acknowledgments 114
III.6 Appendix A. Supplementary data 114
Bibliographie 114

IV Hydrolyse enzymatique et fermentation alcoolique 119
IV.1 Introduction 122
IV.2 Materials and methods 124
IV.2.1 Feedstocks and reagents 124
IV.2.2 Enzymes and other chemicals 125
IV.2.3 Enzymatic hydrolysis 125
IV.2.4 Fermentation 126
IV.2.5 Enzymatic hydrolysis and fermentation scale-up 126
IV.2.6 Sugar, ethanol and inhibitors quantification 126
IV.2.7 Data analysis and number of samples replicate 127
IV.2.8 Enzymatic hydrolysis kinetic modeling 127
IV.3 Results and discussion 128
IV.3.1 Enzymatic hydrolysis 128
IV.3.1.1 Effect of size reduction on the dried substrate 128
IV.3.1.2 Effect of substrate humidity 129
IV.3.1.3 Effect of enzyme loading on the wet substrate 131
IV.3.1.4 Effect of wet substrate loading 132
IV.3.2 Fermentation tests in flasks 133
IV.3.3 Scale-up of the processes : enzymatic hydrolysis and fermentation 134
IV.3.4 Model for enzymatic hydrolysis 135
IV.4 Conclusion 136
IV.5 CRediT authorship contribution statement 137
IV.6 Declaration of Competing 137
IV.7 Acknowledgments 138
IV.8 Experience complémentaires 138

Bibliographie 138

V Modélisation et simulation de bioraffinerie 142

V.1 Introduction 145
V.2 Materials and methods 148
V.2.1 Modeling and simulation 148
V.2.2 Process model overview 148
V.2.2.1 Part 0 : feedstock handling 150
V.2.2.2 Part 1 : Organosolv pretreatment 150
V.2.2.3 Part 2 : Lignin and solvent recovery 150
V.2.2.4 Part 3 : enzymatic hydrolysis and fermentation 153
V.2.2.5 Part 4 : Ethanol recovery 153
V.2.2.6 Parts 5, 6 and 7 : Solid recovery, wastewater treatment, combustion and utilities 154
V.2.3 Key technical parameters 155
V.2.4 Heat integration 157
V.3 Results and discussion 157
V.3.1 Ethanol production mass balance 157
V.3.2 Water mass balance 160
V.3.3 Energy balance 161
V.3.4 Pinch Analysis and further heat integration 161
V.3.5 Effect of co-product markets in production cost 164
V.4 Conclusion 164
V.5 CRediT authorship contribution statement 164
V.6 Declaration of Competing 164
V.7 Acknowledgments 165
Bibliographie 165

Conclusion générale 170

Table des figures

I.1 Schéma explicatif des impacts du changement climatique sur l'environnement et la santé humaine. 10
I.2 Progression de la production d'éthanol carburant par zone. 15
I.3 Prix du litre de bioéthanol dans plusieurs pays. 16
I.4 Évaluation des modes de consommation du bioéthanol en France. 18
I.5 Description synthétique de la voie de production de bioéthanol de première génération. 20
I.6 Classification des différentes voies d'obtention du bioéthanol de 2ème génération. 21
I.7 Structure de la paroi cellulaire de la biomasse lignocellulosique. 23
I.8 Structure chimique de la cellulose. 24
I.9 Structure chimique de l'hémicellulose. 24
I.10 Structure chimique de la lignine. 25
I.11 Classification des différentes classes de prétraitements de la BLC. 26
I.12 Schéma de concept de bioraffinerie basée sur le prétraitement organosolv de la BLC (Zhang et al.; 2016) 35
I.13 Composition moyenne de la biomasse lignocellulosique et principaux produits d'hydrolyse (y compris les inhibiteurs de fermentation). (Almeida et al.; 2007; Klinke et al.; 2004) 37
I.14 Mécanisme d'action des cellulases 42
I.15 Schéma de concept d'une bioraffinerie lignocellulosique 51

II.1 Schéma explicatif des étapes de bioconversion de la BLC en bioéthanol 76
II.2 Photographie de la matière première utilisée dans ce travail : sciure de bois . . . 76
II.3 Schéma de la suite des opérations de fractionnement de la BLC 77
II.4 Extracteurs Soxhlet 79
II.5 Etapes de dosage de l'holocellulose : a. Hydrolyse au chlorite de sodium, b. Chauffage, c. Rajout de chlorite de sodium et acide acétique, d. Filtration, e. Holocellulose après séchage. 81
II.6 Étapes de dosage de l'α-cellulose : a. Hydrolyse alcaline, b. Filtration et lavage, c. α-cellulose après séchage. 82

II.7 Étapes impliquées dans le dosage de la lignine de Klason : a. Mise en contact du substrat avec l'acide H_2SO_4 à 72%, b. Chauffage à 30 °C, c. Dilution à 4%, et d. Mise à l'autoclave. 83
II.8 Réacteur micro-ondes utilisé pour le prétraitement Organosolv (Monowave 450, Anton Paar, Autriche) 84
II.9 Différentes étapes du prétraitement par micro-ondes, (1) : phase de montée en température, (2) : phase de maintien en température, (3) : phase de refroidissement. 85
II.10 Étape de séparation solide/liquide (pâte/liqueur noire) 86
II.11 Schéma des étapes après prétraitement Organosolv avec : +++ : Teneur élevée, ++ : Teneur moyenne et + : Teneur faible 87
II.12 Processus de précipitation de la lignine Organosolv. 89
II.13 Photographie du bain marie utilisé pour l'hydrolyse enzymatique 91
II.14 Photographie du bioréacteur utilisé pour la production d'éthanol 94

III.1 Temperature, pressure and power profile recorded during the Organosolv microwave assisted pretreatment 103
III.2 Effect of sulfuric acid and temperature on the chemical composition of the substrate after the Organosolv pretreatment, (a) : 175 °C and (b) : 190 °C. 107
III.3 Effect of ethanol-water ratio on the chemical composition of the substrate after the Organosolv pretreatment at 0.25% w/w sulfuric acid and 175 °C. 111

IV.1 Evolution of cellulose-to-glucose conversion vs. time at 1.5% (w/v) initial substrate content : effects of drying (wet vs. dry substrate), particle size (>0.5mm vs. <0.5 mm) and enzyme loadings (50 vs. 70 FPU/g). 130
IV.2 Analysis of enzymatic hydrolysis of pretreated sawdust at four different substrate loadings (1.5%, 3.75%, 4.5%, and 5.2% w/v), monitoring the glucose concentration and the cellulose-to-glucose conversion yield. 132
IV.3 Evolution of ethanol, biomass and glucose concentrations in the submerged fermentation broth in flasks (a) : enriched hydrolysate (E.H), and (b) : unenriched hydrolysate (UE.H). 134
IV.4 Evolution of glucose, ethanol and yeast cells concentrations during fermentation scale-up in the bioreactor 136
IV.5 Kinetic model validation based on enzymatic hydrolysis conducted in Erlenmeyer flasks for 3.75, 4.5, and 5.2% (w/v) pretreated substrate loading : (a) the glucose concentration ; (b) the cellulose-to-glucose conversion yield. 137

V.1 Simplified bioethanol production hierarchy block diagram 150
V.2 Simulation flowsheet of the Organosolv pretreatment 151
V.3 Simulation flowsheet for lignin and solvent recovery 152
V.4 Simulation flowsheet for hydrolysis and fermentation steps 154
V.5 Simulation flowsheet of the setup for ethanol separation and purification 156

V.6 Pinch Analysis results curves of the biorefinery : a) composite curves representing hot and cold streams with ΔTmin=10 °C ; b) grand composite curve with hot and cold utilities simulated for the process 163

Liste des tableaux

I.1 Propriétés physico-chimiques de l'essence et de l'éthanol (Ruan et al.; 2019) . . 14
I.2 Synthèse des différents procédés de production d'éthanol. 19
I.3 Teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine de diverses biomasses lignocellulosiques. 22
I.4 Facteurs clés pour un prétraitement efficace de la biomasse lignocellulosique. . . 27
I.5 Facteurs affectant la production de bioéthanol 49
I.6 Prétraitement de l'éthanol avec et sans catalyseur pour la production de biocarburant à partir de biomasse cellulosique. 54

III.1 Chemical composition of the mixed sawmill feedstocks (% w/w of the initial dry sawdust feedstock) 105
III.2 Experimental design and results on the solid phase recovered after microwave-assisted Organosolv pretreatment of mixed sawdust. 106
III.3 Experimental design and results on the liquid phase recovered after microwave-assisted Organosolv pretreatment of mixed sawdust. 109

IV.1 Evolution of size reduction costs of Miscanthus and switchgrass as a function of the output particle size using a hammer mill (data extracted from Shastri et al. (2014)). 129
IV.2 Comparison of kinetic data obtained from the different fermentation trials. . . . 135

V.1 Main process data for simulation of ethanol production from wood waste 149
V.2 Summarizes the data needed to simulate the process. 155
V.3 Process streams mass balance in tons/d of the flowsheet 159
V.4 Comparison of process data between the present studied case and one from the literature (Rodrigues Gurgel da Silva et al.; 2018) for an alternative Organosolv and a diluted acid pretreatment. 160
V.5 Hot and cold streams data of the process including all the different process sections(supply temperature Tin ; target temperature Tout ; heat energy Q ; heat capacity F·Cp) 162

Introduction générale

Les préoccupations environnementales liées au changement et au réchauffement climatique sont d'une importance capitale pour la survie de l'humanité et ont ainsi attiré l'attention des scientifiques du monde entier. L'augmentation des niveaux de gaz à effet de serre, l'épuisement progressif des ressources en pétrole et l'augmentation de la demande en énergie ont rendu nécessaire la recherche de ressources alternatives propres et durables aux combustibles fossiles afin de répondre à la demande de la population tout en maintenant son niveau et sa qualité de vie (Sims et al.; 2010). Actuellement, les ressources en combustibles fossiles comme le charbon et le gaz naturel contribuent largement à la production d'électricité, mais elles assurent aussi plus de 90 % des besoins énergétiques du transport. Dans ce secteur, qu'il s'agisse du transport des biens ou des personnes, seul un certain nombre de biocarburants tels que le bioéthanol, le biodiesel, le biométhane, le biohydrogène et le biobutanol complètent la demande d'énergie en réduisant l'utilisation de carburants à base de pétrole.

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire portent sur la proposition de méthodologies de faisabilité d'une bioraffinerie multi-ressources à caractère lignocellulosique dans le cadre des politiques nationales et mondiale associées à la transition énergétique et à la lutte contre le dérèglement climatique. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du projet de la stratégie de spécialisation intelligente auvergnate intitulé "ressourcement S3" financé par la Région Auvergne-Rhône-Alpes et co-financé par l'Union Européenne (FEDER). Ce projet vise à développer un procédé de production d'éthanol de seconde génération comme biocarburant pour le secteur automobile ou comme molécule plate-forme pour les industries chimiques à partir d'une ressource bois régionale. Il s'insère dans un projet plus vaste intitulé *Mobilisation et bioraffinage de la ressource bois pour la production d'éthanol de seconde génération et la création de molécules à haute valeur ajoutée* qui associe l'Université Clermont Auvergne et l'IRSTEA et qui inclut deux autres thèses : la première sur la valorisation de la fraction de lignine des effluents de prétraitement de biomasse forestière dans des agro-composites, et la seconde sur l'analyse des conditions de sécurisation de l'approvisionnement en biomasse bois d'une unité industrielle régionale de production de bioéthanol.

Les biocarburants sont avantageux, même si leur utilisation présente certaines limitations ; par conséquent, si elle est optimisée, une bioraffinerie peut s'avérer réduire la dépendance aux

carburants à base de pétrole de manière durable. Le bioéthanol s'est imposé comme le premier biocarburant mondial et le marché du bioéthanol a continué de croître rapidement ces dernières années. La demande de pétrole devrait augmenter à hauteur de 57 % de 2002 à 2030 et selon Crop-energies (2016), en 2018, la production mondiale de bioéthanol a augmenté de 2,7 % pour atteindre 154 millions de m^3. Le secteur des carburants en représentait plus de 80 % (97,1 millions de m^3) par an. Les États-Unis sont le leader mondial de la production annuelle de bioéthanol avec 57,5 millions de m^3, suivis du Brésil avec 30 millions de m^3.
Les bioénergies constituent la plus grande ressource en énergies renouvelables disponible à ce jour car elles fournissent de l'énergie de base à la fois sous forme de chaleur, d'électricité et de carburant pour le transport. Cependant, à l'échelle mondiale, elle ne représente que moins de 10 % de la production d'électricité et de 3 % des carburants pour le transport. Une partie de la difficulté à promouvoir l'utilisation des bioénergies réside dans sa chaîne d'approvisionnement complexe, qui dépend de nombreux secteurs économiques. De plus, les projets liés aux bioénergies nécessitent souvent un examen bien plus détaillé de leur durabilité et de leur soutenabilité aussi bien économique qu'environnementale que d'autres technologies à faible émission de carbone et ils réclament donc des cadres réglementaires appropriés (IEA; 2019).

La biomasse lignocellulosique (BLC) est une matière première prometteuse pour les futurs biocarburants renouvelables. En effet, elle constitue un substrat renouvelable abondant et disponible pour la production de bioéthanol qui n'entre pas en compétition avec l'alimentation animale ou humaine. Les matériaux lignocellulosiques sont principalement constitués par un mélange de glucides et de polymères linéaires non ramifiés de glucose, c'est-à-dire la cellulose. Parmi les autres constituants majeurs, on trouve les hémicelluloses qui appartiennent à un groupe de polysaccharides hétérogènes contenant à la fois des sucres carbonés C5 et C6, ainsi que la lignine qui est une molécule complexe avec des unités phénylpropanoïques dans une structure à trois dimensions. Les matières végétales lignocellulosiques contiennent également des protéines et des composés extractibles, représentant une fraction mineure (entre 5 % et 15 %). Les extractibles incluent un très grand nombre de constituants lipophiles et hydrophiles.

Pour produire du bioéthanol par voie biochimique, 3 étapes clés sont nécessaires : le prétraitement qui permet de déstructurer la matrice lignocellulosique afin de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes, l'hydrolyse enzymatique qui a pour but de produire des sucres fermentescibles et la fermentation qui permet de transformer ces sucres en éthanol. Le prétraitement est la première et la plus importante étape dans le traitement de la biomasse lignocellulosique. Il s'agit d'un processus clé par lequel la structure récalcitrante de la biomasse lignocellulosique pourrait être modifiée de manière à la rendre accessible à d'autres processus ou réactions. Après celui-ci, il sera donc possible de transformer les polymères glucidiques en sucres simples fermentescibles par hydrolyse enzymatique, puis en biocarburant ou en d'autres produits dérivés.
Le prétraitement Organosolv est une méthode efficace et prometteuse qui utilise un solvant organique ou un mélange de solvants incluant éventuellement de l'eau afin d'éliminer la lignine

en amont de l'hydrolyse enzymatique de la fraction cellulosique. En plus de l'élimination de la lignine, une hydrolyse des hémicelluloses entraîne une digestibilité enzymatique améliorée de cette fraction. Les solvants communément mis en œuvre dans ce procédé comprennent l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'éthylène glycol. Les températures utilisées peuvent atteindre 250 °C, mais des températures plus basses peuvent être suffisantes en fonction, par exemple, du type de biomasse et de l'ajout d'un catalyseur. Les catalyseurs possibles comprennent les acides organiques et inorganiques.
Toutefois, le solvant lui-même peut être un inhibiteur lors des étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation. Par conséquent, il doit être partiellement voire totalement éliminé avant la fermentation. L'élimination et la récupération du solvant sont également nécessaires afin de réduire l'impact du procédé sur l'environnement ainsi que ses coûts opératoires. Les avantages du prétraitement Organosolv peuvent se résumer comme suit :

i) Il abaisse potentiellement le coût des enzymes nécessaires pour l'hydrolyse en séparant plus efficacement la lignine de la fraction cellulosique en amont de l'étape d'hydrolyse enzymatique. De plus, il confère une meilleure accessibilité aux fibres de cellulose, l'adsorption des enzymes cellulosiques sur la lignine étant défavorisée par l'élimination préalable de celle-ci.
ii) Il produit une lignine de haute qualité, qui pourrait faciliter des applications à forte valeur ajoutée de ce coproduit du prétraitement, comme la production de produits chimiques (molécules plate-formes).

La France est dotée d'un énorme potentiel lignocellulosique provenant des activités agricoles et forestières. Ces ressources assureront l'avenir du développement de bioraffineries d'éthanol lignocellulosique promulguée par la politique gouvernementale en faveur de l'utilisation d'énergies nouvelles. A cet effet, un plan d'action fondé sur l'article 4 de la directive 2009/28/CE de l'Union Européenne fixe à 23 % la part des énergies renouvelables dans la consommation d'énergie finale de la France à atteindre d'ici 2020. Or, environ 50 %, de ces énergies seront produites à partir de biomasse, essentiellement dans les secteurs "transports" et "chauffage".

L'objectif de cette étude est de proposer un procédé complet et applicable industriellement, permettant la production simultanée d'éthanol et d'autres produits à haute valeur ajoutée dans une bioraffinerie forestière. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte. Afin de les résumer, ce présent mémoire se décline en cinq chapitres :

Le chapitre I est une étude bibliographique consacrée dans un premier temps à la mise en contexte de ce travail dans le cadre du défi énergétique mondial au sens large avant de se recentrer sur une synthèse de bioéthanol lignocellulosique par voie biochimique qui se se décline en trois sous-parties : une partie sur les prétraitements, une deuxième sur l'hydrolyse (enzymatique ou chimique) et finalement une dernière sur la fermentation alcoolique. Dans tout les cas, une analyse des différents paramètres influençant significativement chacune des étapes est détaillée.

Le chapitre II donne un aperçu sur le matériel et les méthodes expérimentales utilisées dans cette étude. Les dispositifs expérimentaux pour la conduite des expériences de prétraitement, d'hydrolyse et de fermentation, ainsi que l'ensemble des conditions opératoires et des outils de caractérisation physiques et biochimiques utilisés y sont décrits en détails.

Le chapitre III concerne l'optimisation du traitement Organosolv, l'extraction de la lignine Organosolv et l'étude de l'impact des conditions opératoires sur le rendement et la pureté de la cellulose, la récupération de la lignine et la formation d'inhibiteurs.

Le chapitre IV a pour finalité de démontrer la faisabilité de production du bioéthanol à partir du substrat prétraité. Dans un premier temps, des essais d'hydrolyse enzymatique ont été conduits dans plusieurs conditions opératoires. Dans un deuxième temps, des tests de fermentation ont été effectués dans le cas d'hydrolysats liquides les plus concentrés en sucre. En dernier lieu, les résultats expérimentaux concernant notamment le suivi biochimique au cours de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation sont exposés et commentés.

Ensuite, le chapitre V présente une étude de modélisation classique de bioraffinerie à l'échelle du procédé à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur. Cette modélisation est fondée sur les données expérimentales obtenues au cours des chapitres précédents qui ont été utilisées pour estimer les performances des opérations unitaires correspondantes. Le modèle s'appuie sur un schéma générique de procédé, largement utilisé dans la littérature, que nous avons modifié. En plus des étapes de prétraitement, d'hydrolyse et de fermentation, il décrit en détail les étapes de la régénération du solvant et de la purification de l'éthanol. Il étudie aussi de façon plus générale l'intégration énergétique et la réutilisation de l'eau. Les résultats des simulations sont détaillés et confrontés aux études similaires disponibles dans la littérature, ainsi qu'à celles décrivant d'autres procédés de prétraitement que l'Organosolv à l'échelle de la bioraffinerie.

Enfin, une conclusion générale faisant la synthèse de l'ensemble des résultats, expérimentaux et numériques, des contributions originales de ces travaux de recherche, ainsi que des perspectives envisageables pour leur poursuite, clôture ce manuscrit.

Bibliographie

Crop-energies (2016). Bioethanol as a growth market bioethanol-biofuel no. 1 worldwide. available from. http://www.cropenergies.com/Pdf/en/Bioethanol/Markt/Dynamisches_Wachstum.pdf, consulté le 07/01/2020".

IEA (2019). International energy agency 2017. https://www.iea.org/fuels-and-technologies/bioenergy, consulté le 07/01/2020".

Sims, R. E., Mabee, W., Saddler, J. N. and Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies, *Bioresource Technology* **101**(6) : 1570–1580.

Chapitre I

Revue Bibliographique

« Entre ce que je pense,
Ce que je veux dire,
Ce que je crois dire,
Ce que je dis,
Ce que vous avez envie d'entendre,
Ce que vous entendez,
Ce que vous comprenez...
Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer. Mais essayons quand même... »

Bernard Werber

Sommaire

I.1 Dérèglement climatique et concept de transition énergétique 9
I.2 Le secteur des transports : un géant, consommateur d'énergie et émetteur de gaz à effet de serre 10
I.3 Les biocarburants 12
I.4 Bioéthanol 13
I.4.1 Coûts de production du bioéthanol en fonction du procédé 15
I.4.2 Principaux modes de consommation du bioéthanol 17
I.4.2.1 Consommation par l'industrie 17
I.4.2.2 Consommation pour la mobilité 17
I.5 Principaux modes de production d'éthanol 18
I.5.1 Éthanol non renouvelable : Éthanol synthétique 19
I.5.2 Éthanol renouvelable : 1ère génération 19
I.5.3 Éthanol renouvelable : 2ème génération 20
I.6 La biomasse lignocellulosique, matière première pour le bioéthanol 22
I.6.1 Structure de la biomasse lignocellulosique 22
I.6.2 Cellulose 23
I.6.3 Hémicelluloses 24

I.6.4 Lignine 24
I.6.5 Les extractibles 25
I.7 Prétraitement de la biomasse lignocellulosique 25
I.7.1 Prétraitement physique : comminution 27
I.7.2 Prétraitement biologique 28
I.7.3 Prétraitement physico-chimique 29
I.7.3.1 Prétraitement à la vapeur (PV) 29
I.7.3.2 Explosion à l'ammoniac (AFEX) 30
I.7.3.3 Prétraitement par voie hydrothermale 30
I.7.4 Prétraitement chimique 31
I.7.4.1 Prétraitement à acide dilué 31
I.7.4.2 Prétraitement à la chaux et prétraitement par oxydation humide 32
I.7.4.3 Prétraitement à l'explosion au dioxyde de carbone (CO_2) . . . 32
I.7.4.4 Prétraitement aux liquides ioniques 33
I.7.4.5 Prétraitement Organosolv : généralités 33
I.8 Composés toxiques générés pendant le prétraitement de la BLC . . 36
I.8.1 Les furanes 37
I.8.2 Les acides carboxyliques 38
I.8.3 Les composés phénoliques 38
I.9 Méthodes d'hydrolyse décrites dans la littérature 39
I.9.1 Hydrolyse chimique 39
I.9.2 Hydrolyse enzymatique 40
I.9.3 Facteurs limitants de l'hydrolyse enzymatique 43
I.9.3.1 Facteurs liés aux conditions opératoires, température, pH et agitation 43
I.9.3.2 Effet du séchage du substrat 44
I.9.3.3 Charge d'enzymes et de substrats 44
I.9.3.4 Effet de la concentration en eau 45
I.9.3.5 Effet des inhibiteurs 45
I.10 Fermentation éthanolique 46
I.10.1 Généralités 46
I.10.2 Facteurs d'influence de la fermentation 47
I.10.2.1 Effet de la température 47
I.10.2.2 Effet de la concentration en sucres 48
I.10.2.3 Effet du pH 48
I.10.2.4 Effet de la durée de fermentation 48
I.10.2.5 Effet de l'agitation 48
I.10.2.6 Effet de la concentration de l'inoculum 49
I.11 Concept de bioraffinerie 49
I.12 Stratégie de choix de solvant du procédé Organosolv 50
I.13 Objectifs spécifiques de ce travail de doctorat 55
Bibliographie 55

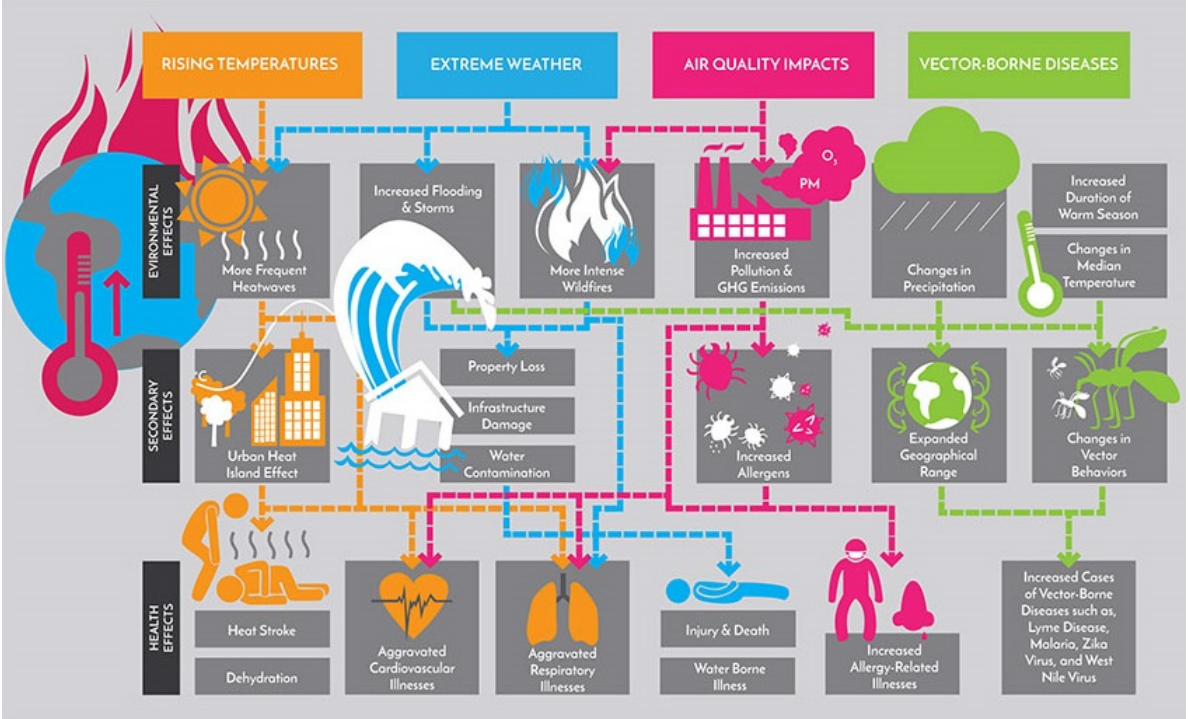
Préambule

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps contextualiser ce travail dans le cadre du défi énergétique mondial, puis exposer succinctement le concept de biocarburant, avant de recentrer nos propos sur le bioéthanol lignocellulosique produit par voie biochimique qui fait intervenir trois étapes clés : une étape de prétraitement, une hydrolyse enzymatique ou chimique et finalement une étape de fermentation alcoolique. Enfin, nous ferons un point sur les travaux de la littérature qui abordent le prétraitement de la biomasse lignocellulosique (BLC) en général et le prétraitement Organosolv au cœur de ce travail en particulier.

I.1 Dérèglement climatique et concept de transition énergétique

Le changement climatique est l'un des problèmes mondiaux les plus urgents pour la société. Ainsi, il est associé à une élévation du niveau de la mer et des températures atmosphériques, une augmentation des surfaces recouvertes par les eaux, ainsi qu'à une diminution du pH des océans et des régimes de précipitations (Borja; 2014; Vegter et al.; 2014). Le niveau de la mer peut augmenter à mesure que les glaciers fondent, les températures peuvent augmenter à mesure que la planète se réchauffe et les océans devenir plus acides en raison de l'augmentation de la teneur en dioxyde de carbone dissous. Ces changements peuvent avoir d'importantes répercussions sur la conservation, du niveau de l'organisme à celui de l'écosystème. Par exemple, la propagation des espèces envahissantes devrait augmenter avec la disponibilité d'un habitat convenable (Hawkins; 2012; Ojaveer et al.; 2014; Vegter et al.; 2014). De plus, la fortification artificielle et la modification des habitats côtiers pourraient devenir omniprésentes le long des rivages pour éviter les impacts de l'élévation du niveau de la mer ; de même, les plastiques et autres polluants pourraient se propager vers des zones auparavant non contaminées en raison de conditions météorologiques et de précipitations de plus en plus extrêmes (Airoldi et al.; 2005; Vegter et al.; 2014). On ne sait pas encore comment ces innombrables impacts interagiront les uns avec les autres. Cependant, les changements climatiques futurs entraîneront sans aucun doute des changements encore plus spectaculaires que ceux observés jusqu'à présent et affecteront en particulier de nombreux écosystèmes marins, ce qui pourrait contrecarrer les efforts de conservation actuels (Magris et al.; 2014).
Selon la Figure I.1, les effets du changement climatique sur les espèces et les communautés peuvent être assez variables et prendre au moins quatre formes : hausse des températures, conditions météorologiques extrêmes, impacts sur la qualité de l'air, maladies à transmission vectorielle (Hughes; 2000). Les méta-analyses ont montré qu'environ 80 % de toutes les observations citées ci-dessus sont cohérentes avec les nombreux impacts potentiels du changement climatique tant environnementalement que sur la santé humaine (Borja; 2014). De plus, le changement climatique peut affecter différents systèmes et leur biodiversité de différentes manières (Vegter et al.; 2014) ; ainsi, la sensibilité ou l'adaptation des espèces dépendra à la fois du degré de modification de leur environnement et de leurs caractéristiques biologiques intrinsèques (Lascelles et al.; 2014).

A la vue des différents impacts liés au changement climatique, le concept de «transition énergétique» est désormais largement utilisé dans les études énergétiques et a été intégré dans les politiques énergétiques nationales de nombreux pays. Bien que les implications d'un changement de conditions soient suffisamment claires, il n'y a pas de consensus sur un état final souhaité. La transition énergétique est donc une voie vers la transformation du secteur énergétique mondial de l'énergie fossile vers une énergie zéro carbone d'ici la seconde moitié de ce siècle. Au cœur se trouve la nécessité de réduire les émissions de CO_2 liées à l'énergie pour limiter le changement climatique (Lindmark et al.; 2011). La décarbonation du secteur de l'énergie nécessite une action urgente à l'échelle mondiale et, alors qu'une politique mondiale de transition énergétique



Source : Brusseau et al. (2019)

FIGURE I.1: Schéma explicatif des impacts du changement climatique sur l'environnement et la santé humaine.

mondiale commence à émerger, des mesures supplémentaires sont cependant nécessaires pour réduire les émissions de carbone et atténuer les effets du changement climatique (Vegter et al.; 2014).

Par ailleurs, selon une étude d'évaluation menée en 2015 par l'IRENA (International Renewable Energy Agency), les voies de décarbonation possibles pour une meilleure transition énergétique sont les suivantes : les technologies de l'information, les technologies intelligentes, et le développement de la part des énergies renouvelables dans le secteur énergétique. Ainsi, vu sous cet angle, les énergies renouvelables offrent un moyen immédiat de décarboner le mix énergétique mondial. Le doublement de la part des énergies renouvelables d'ici 2030 pourrait générer environ la moitié des réductions d'émissions requises et, couplé à l'efficacité énergétique, maintenir l'augmentation moyenne des températures mondiales en dessous de 2 °C, prévenant ainsi des changements climatiques catastrophiques.

I.2 Le secteur des transports : un géant, consommateur d'énergie et émetteur de gaz à effet de serre

Le transport et l'énergie sont fortement liés par la physique car la mise en mouvement d'une masse (passagers, véhicules, fret, etc.) nécessite une quantité d'énergie proportionelle à celle-ci. La question est de savoir avec quelle efficacité cette énergie est captée pour une utilisation efficiente, ce qui est fortement lié au mode de transport considéré et aux objectifs du transport.

En effet, la relation entre le transport et l'énergie est directe, mais sujette à des interprétations différentes car elle concerne différents modes de transport, chacun ayant sa propre utilité et son propre niveau de performance (Jia et al.; 2009). Un compromis entre vitesse et consommation d'énergie est souvent recherché, car lié aux retombées économiques souhaitées. Ainsi, les passagers et les marchandises de grande valeur peuvent être transportés par des modes rapides mais énergivores car la composante temps de leur mobilité a tendance à avoir une valeur élevée, ce qui traduit la volonté d'utiliser plus d'énergie. Les économies d'échelles, principalement celles réalisées par le transport maritime, sont liées à de faibles niveaux de consommation d'énergie par unité de masse transportée, mais à une vitesse moindre (García-Olivares et al.; 2018). Cela correspond relativement bien aux impératifs du transport de marchandises, en particulier pour le vrac. Comparativement, le fret aérien a des niveaux de consommation d'énergie élevés liés aux services à grande vitesse.

Une tendance apparue depuis les années 50 concerne la part croissante des transports dans la consommation mondiale totale de pétrole ; les transports représentent environ 25 % de la demande mondiale d'énergie et environ 61,5 % de tout le pétrole utilisé chaque année (García-Olivares et al.; 2018). Les impacts des transports sur la consommation d'énergie sont divers, notamment sur les activités nécessaires à la mise à disposition des infrastructures et équipements de transport :

Le transport terrestre représente la grande majorité de la consommation d'énergie. Le transport routier à lui seul consomme en moyenne 85 % de l'énergie totale utilisée par le secteur des transports dans les économies développées. Cette tendance n'est pas uniforme dans le secteur du transport terrestre lui-même, car le transport routier est presque le seul mode responsable de la demande supplémentaire en énergie au cours des 25 dernières années. Malgré une part de marché en baisse, le transport ferroviaire, sur la base de 1 kg d'équivalent pétrole, reste quatre fois plus efficace pour les passagers et deux fois plus efficace pour le transport de marchandises que le transport routier. Le transport ferroviaire représente 6 % de la demande mondiale en énergie pour les transports.

Le transport maritime représente 90 % du commerce mondial transfrontalier, mesuré en volume. La nature du transport par voie maritime et ses économies d'échelle en font le mode le plus économe en énergie puisqu'il n'utilise que 7 % de toute l'énergie consommée par les activités de transport, un chiffre bien inférieur à sa contribution à la mobilité des marchandises. Pour les opérations du terminal, les chiffres varient, mais un terminal à conteneurs a généralement 70 % de sa consommation d'énergie fournie par les combustibles fossiles et 30 % par l'électricité (García-Olivares et al.; 2018).

Le transport aérien fait partie intégrante de la mondialisation des réseaux de transport. L'industrie aéronautique représente 8 % de l'énergie consommée par les transports. Le transport aérien a des niveaux de consommation d'énergie élevés, liés à des vitesses élevées. Le carburant est le deuxième coût le plus important pour l'industrie du transport aérien, représentant 13 à 20 % des dépenses totales. Les innovations technologiques, telles que des moteurs plus efficaces et une meilleure aérodynamique, ont conduit à une amé-

lioration continue de l'efficacité énergétique de chaque nouvelle génération d'avions.

Le secteur des transports est également connu pour être un gros émetteur de GES. En effet, la quasi-totalité de la consommation d'énergie du secteur des transports est constituée de combustibles fossiles. En fait, selon l'Agence européenne pour l'environnement, l'UE-25 en dépend à 98 %. La combustion de combustibles fossiles produit non seulement du dioxyde de carbone (CO_2), mais aussi d'autres émissions de coproduits (NO_x, produits soufrés, particules fines, etc.), tous résultant de l'activité humaine, dont la plupart sont nocifs pour la santé humaine et l'environnement (Wu; 2007; He et al.; 2005). Les quantités et le profil de ces émissions dépendent de la quantité et de la qualité du carburant utilisé, de la technologie utilisée pour la combustion, des technologies en bout de chaîne (filtres, convertisseurs catalytiques) et d'autres facteurs tels que la vitesse, le facteur de charge, la température et l'entretien du moteur (García-Olivares et al.; 2018).

I.3 Les biocarburants

Les biocarburants existent depuis plus longtemps que les voitures, mais l'essence et le diesel bon marché les ont maintenus longtemps en marge. La flambée des prix du pétrole, et maintenant les efforts mondiaux pour conjurer les pires effets du changement climatique, ont donné une nouvelle urgence à la recherche de carburants propres et renouvelables.

Nos voyages par route, nos vols et nos expéditions représentent près d'un quart des émissions mondiales de gaz à effet de serre, et le transport reste aujourd'hui fortement tributaire des combustibles fossiles. L'idée derrière le biocarburant est de remplacer les carburants traditionnels par ceux fabriqués à partir de matières végétales ou d'autres matières premières renouvelables (García-Olivares et al.; 2018).

Mais l'idée d'utiliser les terres agricoles pour produire du carburant au lieu de la nourriture présente ses propres défis, et les solutions qui reposent sur les déchets ou d'autres matières premières n'ont pas encore été en mesure de rivaliser en termes de prix et de tonnages avec les carburants conventionnels. La production mondiale de biocarburants doit tripler d'ici 2030 afin d'atteindre les objectifs de croissance durable de l'Agence internationale de l'énergie. Il existe différentes façons de produire des biocarburants ; elles reposent généralement sur des réactions chimiques, la fermentation et la chaleur pour décomposer les amidons, les sucres et d'autres molécules issues de la biomasse. Les produits résultants sont ensuite raffinés pour produire un carburant que les voitures ou autres véhicules peuvent utiliser.

Aux États-Unis, une grande partie de l'essence contient l'un des biocarburants les plus courants : l'éthanol. Fabriqué en fermentant les sucres de plantes telles que le maïs ou la canne à sucre, l'éthanol contient de l'oxygène qui aide le moteur d'une voiture à brûler le carburant plus efficacement, réduisant ainsi la pollution de l'air. Aux États-Unis, la majorité de l'éthanol est dérivé du maïs avec un carburant généralement composé à 90 % d'essence et à 10 % d'éthanol. Au Brésil, deuxième producteur mondial d'éthanol derrière les États-Unis, le carburant contient jusqu'à 27 % d'éthanol, la canne à sucre étant la principale matière première (Crop-energies;

2016).

Les alternatives au bioéthanol comprennent le biodiesel et le diesel renouvelable. Le biodiesel, dérivé de graisses telles que l'huile végétale, les graisses animales et la graisse de cuisson recyclée, peut être mélangé avec le diesel issu du pétrole (Aubert et al.; 2017). Aux États-Unis, certains autobus, camions et véhicules militaires fonctionnent avec des mélanges de carburants contenant jusqu'à 20 % de biodiesel, mais l'usage du biodiesel pur est limité par sa sensibilité au froid et peut causer des problèmes dans les véhicules plus anciens. Le diesel renouvelable, un produit chimiquement différent qui peut être dérivé de graisses ou de déchets d'origine végétale, est considéré comme un carburant «sans rinçage» qui n'a pas besoin d'être mélangé au diesel conventionnel.

D'autres types de carburants d'origine végétale ont été créés pour l'aviation et le transport maritime. Plus de 150 000 vols ont utilisé du biocarburant, mais la quantité de biocarburant aviation produite en 2018 représentait moins de 0,1 % de la consommation totale. Dans le transport maritime également, l'adoption de biocarburants se situe à des niveaux bien inférieurs aux objectifs de 2030 fixés par l'Agence internationale de l'énergie (IEA; 2019).

Le gaz naturel renouvelable, ou biométhane, est un autre carburant qui pourrait potentiellement être utilisé non seulement pour le transport, mais également pour la production de chaleur et d'électricité. Un biogaz peut être produit à partir de la biomasse des décharges, des exploitations d'élevage, des eaux usées ou d'autres sources. Ce biogaz capté doit ensuite être épuré pour éliminer l'eau, le dioxyde de carbone et d'autres éléments afin de répondre à la norme requise pour alimenter les véhicules fonctionnant au gaz naturel (García-Olivares et al.; 2018; Jia et al.; 2009).

I.4 Bioéthanol

L'éthanol est également connu sous le nom d'alcool éthylique. Sa formule moléculaire est CH_3CH_2OH. Le *bioéthanol*, ou éthanol biosourcé, est de l'éthanol produit par fermentation à partir de biomasse. Le même composé organique se rencontre dans les boissons alcoolisées. De nos jours, le bioéthanol est le biocarburant liquide le plus utilisé au monde. Il est principalement produit par fermentation microbienne de sucre ou d'amidon à partir de diverses matières premières, y compris la canne à sucre, la betterave à sucre, le maïs, les céréales, les déchets agricoles, les déchets forestiers, les déchets municipaux, les fumiers de bétail, etc. Lorsque les sucres sont présents sous forme de polysaccharides, un processus d'hydrolyse (acide ou enzymatique) est généralement utilisé pour la délignification et la formation de sucres fermentescibles avant la fermentation. À l'aide de micro-organismes (par exemple, la levure), les sucres hydrolysés (par exemple, le glucose) sont convertis en éthanol (bioéthanol) pendant le processus de fermentation. La distillation et la déshydratation sont ensuite utilisées pour produire un alcool sans indice d'octane élevé, également appelé éthanol déshydraté ou éthanol anhydre (Champagne; 2008; Escobar et al.; 2009).

Le bioéthanol produit peut être directement utilisé comme substitut de l'essence dans les mo-

teurs. Le tableau I.1 illustre les propriétés physico-chimiques de l'essence et de l'éthanol (bioéthanol). On peut observer que l'éthanol a un pouvoir calorifique inférieur (21,1 MJ/L) à celui de l'essence (30 – 33 MJ/L), donc plus d'éthanol est nécessaire pour obtenir le même rendement. Cependant, l'indice d'octane plus élevé de l'éthanol permet d'utiliser un taux de compression du moteur plus élevé, ce qui conduit à une efficacité thermique améliorée et à une puissance accrue, réduisant ainsi quelque peu la différence de consommation de carburant (Cruz et al.; 2014). Il a également été observé qu'il existe des différences importantes entre les autres propriétés des deux carburants, par exemple, viscosité, gravité spécifique, point de congélation, point d'ébullition, point d'éclair, pression de vapeur, limite d'inflammabilité, température d'auto-inflammation, richesse nécessaire du mélange air-carburant, etc.

Table I.1: Propriétés physico-chimiques de l'essence et de l'éthanol (Ruan et al.; 2019)

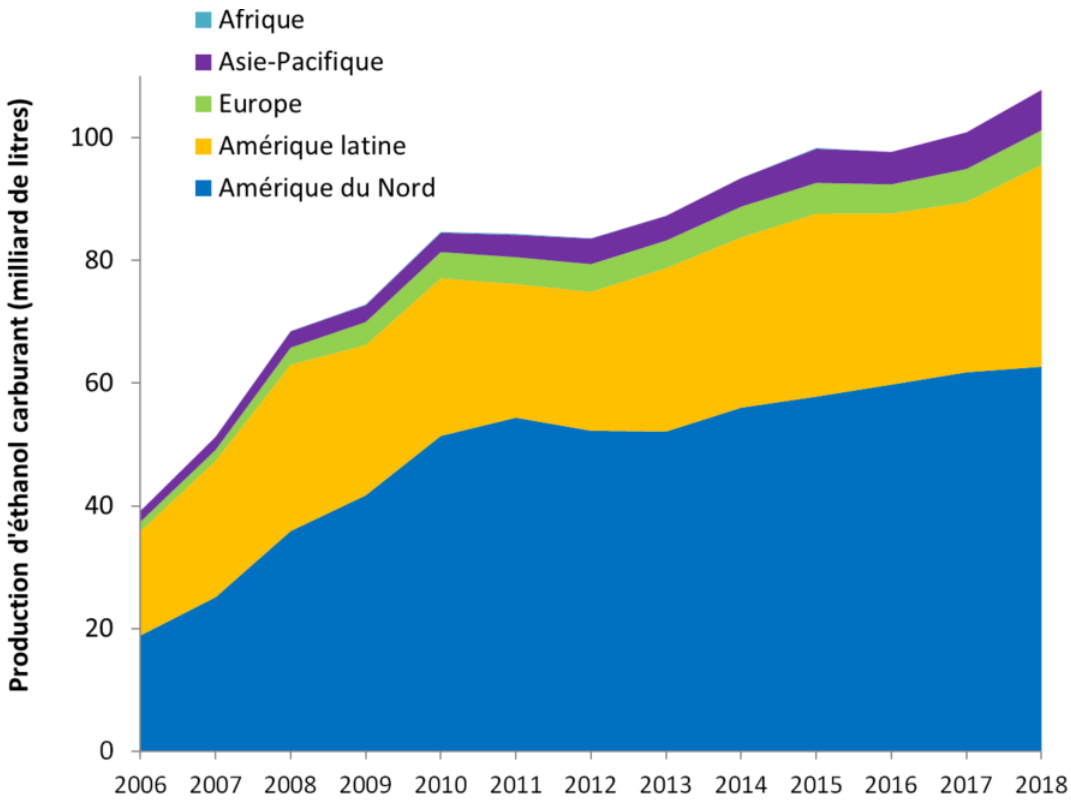
Propriétés	Essence	Éthanol
Formule	C_4 to C_{12}	C_2H_5OH
Poids moléculaire	100–105	46,07
Densité à 15 °C (kg/L)	0,69–0,79	0,79
Densité (densité relative) à 15 °C	91	106–110
Point de congélation (°C)	- 40	- 114
Point d'ébullition (°C)	27–225	78
Pression de vapeur à 38 °C (kPa)	48–103	15,9
Chaleur spécifique (kJ/kg/K)	2,0	2,4
Viscosité à 20 °C (mPa.s)	0,37–0,44	1,19
Pouvoir calorifique inférieur (kJ/L)	30–33	21,1
Point d'éclair (°C)	- 43	13
Température d'auto-inflammation (°C)	257	423
Limite inférieure d'inflammabilité (%vol)	1,4	4,3
Limite supérieure d'inflammabilité (%vol)	7,6	19,0
Rapport stœchiométrique air-carburant	14,7	9,0
Indice d'octane de recherche	88–100	108,6
Indice d'octane moteur	80–90	89,7

Pour améliorer la qualité du carburant comme la volatilité, l'indice d'octane, le démarrage à froid, le fonctionnement à chaud et la consommation de carburant, le bioéthanol est généralement mélangé avec de l'essence. Par exemple, le E5 (5 % d'éthanol et 95 % d'essence) et le E25 (25 % d'éthanol et 75 % d'essence) ne nécessitent aucune modification de l'équipement ou des réglages du moteur (Naik et al.; 2010). Un carburant plus riche en éthanol, le Superéthanol ou E85 (jusqu'à 85 % d'éthanol), est également commercialisé dans quelques pays du pays y compris la France, mais il nécessite un moteur spécifique FlexFuel ou l'ajout d'un kit de conversion à un moteur essence.

En outre, le bioéthanol peut être utilisé dans les tracteurs, les avions et les bateaux (Morone and Pandey; 2014). Il peut servir comme exhausteur d'octane pour remplacer le plomb tétraéthyle (Demain and Báez-Vásquez; 2013) et comme produit chimique de base pour la production d'éthylène et d'éthylène glycol. Il peut également être utilisé comme additif pour augmenter le pourcentage d'oxygène du carburant, ce qui réduit les émissions de CO et d'aromatiques (García;

2016).

La Figure I.2 montre l'évolution de la production mondiale d'éthanol par pays ou par région, entre 2007 et 2017. Celle-ci a atteint un sommet en 2017 après une baisse en 2011 et 2012. Les États-Unis sont le plus grand producteur d'éthanol au monde, ayant produit près de 16 milliards de gallons en 2017. Ensemble, les États-Unis et le Brésil produisent 85 % de l'éthanol mondial. La grande majorité de l'éthanol américain est produite à partir de maïs, tandis que le Brésil utilise principalement la canne à sucre. En France, il provient essentiellement de la betterave à sucre.



Source : IFPEN (2019), d'après FO Licht's

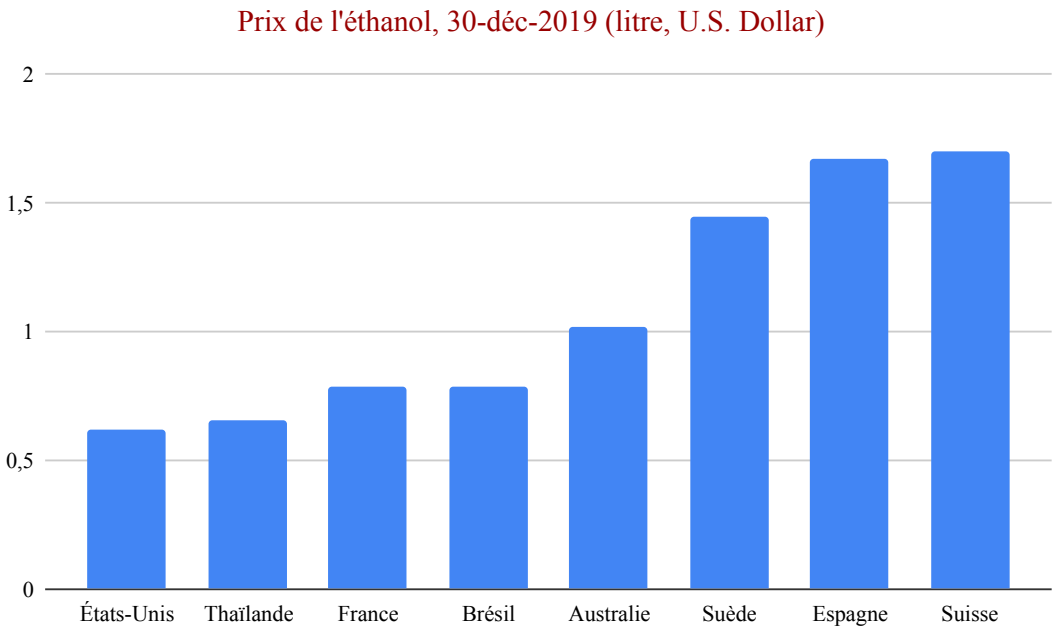
FIGURE I.2: Progression de la production d'éthanol carburant par zone.

I.4.1 Coûts de production du bioéthanol en fonction du procédé

Les coûts de production de bioéthanol sont déterminés par les coûts d'investissement, les coûts des matières premières (qui sont fonction des coûts agricoles, de la productivité et de l'offre/demande du marché), des coûts de fonctionnement et d'entretien et de l'efficacité du procédé. Cependant, les coûts de production totaux du bioéthanol conventionnel (ou de 1ère génération) sont dominés par les coûts des matières premières, c'est-à-dire des cultures vivrières ou fourragères riches en sucre ou en amidon. Étant donné que l'efficacité de conversion des biocarburants conventionnels approche de ses limites, les possibilités de réduction des coûts pour les biocarburants conventionnels sont limitées.

Le bioéthanol conventionnel produit à partir de l'amidon (par exemple le maïs ou le blé) et des

cultures sucrières (par exemple la canne à sucre et les betteraves à sucre) est le plus grand contributeur à la production totale de biocarburants et représente donc la plus grande contribution renouvelable au transport. En 2019, la production de bioéthanol a été multipliée par 1,31 par rapport à 2016, avec 154 milliards de litres de bioéthanol produits dans le monde (IEA; 2019). En 2019, l'éthanol conventionnel produit à partir de maïs aux États-Unis aurait coûté entre 0,61 et 0,70 USD par litre d'équivalent essence (LEE), tandis que l'éthanol brésilien de canne à sucre aurait coûté entre 0,70 USD/LEE et 0,78 USD/LEE. La Figure I.3 met en évidence les différences de prix du litre d'éthanol entre différents pays.



Source : globalpetrolprices.com (2019)

FIGURE I.3: Prix du litre de bioéthanol dans plusieurs pays.

Caractérisés par des procédés plus complexes, le bioéthanol avancé (non-conventionnel) produit à partir de matières premières lignocellulosiques a des coûts estimés plus élevés que les technologies conventionnelles du bioéthanol. Le bioéthanol avancé coûterait entre 1,04 USD et 1,45 USD/LEE aux prix actuels. Cependant, à mesure que les investissements en R&D augmentent et que les projets avancés de bioéthanol à l'échelle commerciale gagnent en expérience, les technologies de bioéthanol avancé pourraient voir les coûts de production tomber à 0,70 USD/LEE pour des coûts de matières premières de 30 USD/tonne sèche, et à 1,0 USD/LEE pour des coûts de matières premières de 100 USD/tonne dans la prochaine décennie (IRENA; 2013).

I.4.2 Principaux modes de consommation du bioéthanol

De façon globale, il existe trois marchés pour le bioéthanol dans le monde : les boissons, les carburants et les applications industrielles.

I.4.2.1 Consommation par l'industrie

Comme de nombreux produits chimiques simples, le bioéthanol occupe une place de molécule plate-forme pour les industries chimiques et parachimiques. Ses applications industrielles comprennent des utilisations finales importantes où il joue le même rôle que l'éthanol obtenu par voie chimique, telles que :

- produits pharmaceutiques ;
- cosmétiques et articles de toilette ;
- détergents et produits de nettoyage ;
- encres d'imprimerie ;
- peintures et revêtements ;
- lavage d'écran et dégivreurs pour l'industrie automobile ;
- biocides et autres utilisations médicales ;
- production d'importants intermédiaires chimiques, comme pour les polymères et les plastiques.

Ainsi, à l'échelle de la France, il est consommé de façon diffuse dans l'industrie agro-alimentaire (22 %). Il est également utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la production des médicaments (2 %) et la synthèse de composés chimiques (1 %) ; 3 % vont dans l'industrie des parfums et cosmétiques (Figure I.4). Malgré des besoins différents selon les pays, l'utilisation de l'éthanol comme carburant dans le secteur du transport reste toujours majoritaire (66 %).

I.4.2.2 Consommation pour la mobilité

L'usage du bioéthanol pour la mobilité s'est généralisé pour les moteurs essence en France et dans beaucoup de pays, et ce parce que le bioéthanol est un biocarburant que l'on incorpore à l'essence. Ainsi, l'éthanol biosourcé est majoritairement destiné à être utilisé comme carburant, soit environ 66 % de la consommation de l'éthanol en France selon le Syndicat National des Producteurs d'Alcool Agricole. Cet éthanol doit être anhydre (moins de 1 % d'eau) et il est dénaturé (rendu impropre à la consommation humaine) pour une utilisation pour le transport, en ajoutant 2 à 5 % en volume de dérivés pétroliers, généralement des pentanes. Cet éthanol dénaturé est principalement utilisé en mélange à faible concentration avec de l'essence moteur pour son apport en oxygène ou comme activateur (booster) d'octane. À des concentrations élevées, il est utilisé pour alimenter des véhicules à carburant alternatif spécialement conçus pour son utilisation. Ainsi, différentes flottes de véhicules à éthanol s'inscrivant dans une conception évolutive de la mobilité (moins carbonée et plus diversifiée), sont déployées depuis quelques

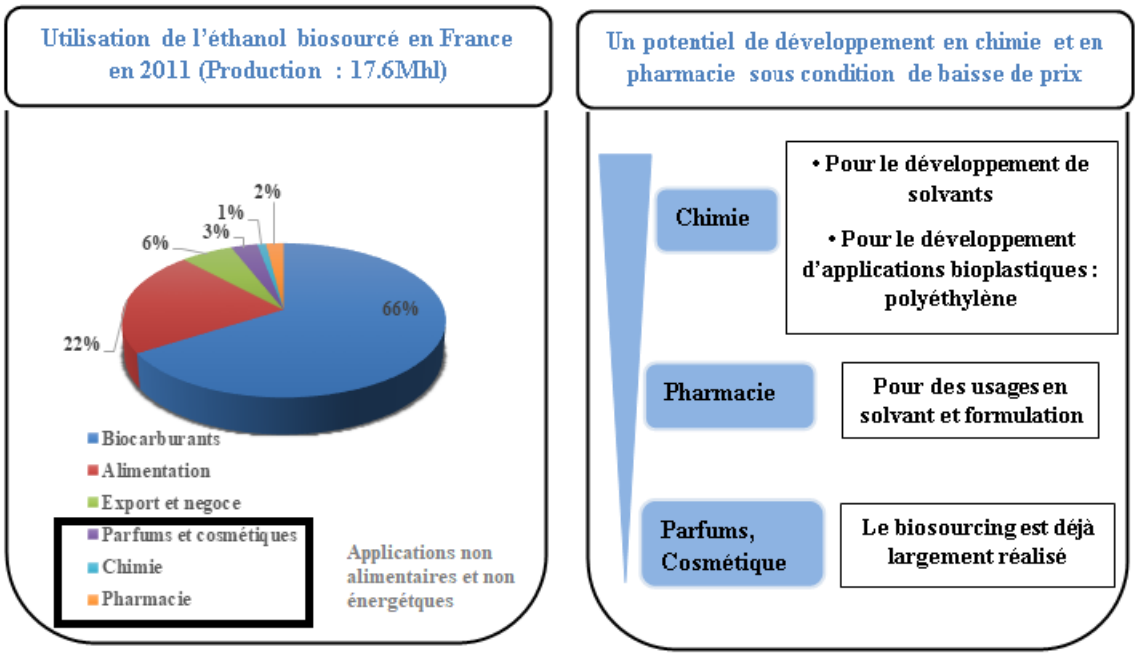


FIGURE I.4: Évaluation des modes de consommation du bioéthanol en France.

années. Toujours selon le Syndicat National des Producteurs d'Alcool Agricole, l'utilisation de bioéthanol comme carburant permet de réduire de près de 50% les émissions de gaz à effet de serre par rapport aux carburants conventionnels fossiles, ce qui représente un atout non négligeable en termes environnementaux.
Sur le plan économique, le bioéthanol présente un autre avantage majeur : il est bien moins cher à la pompe que l'essence, même s'il faut bien avouer que cela provient de subventions à la production ou de taxes réduites à la vente. Dans un contexte de hausse à long terme du prix des produits pétroliers liés à l'épuisement des ressources, le bioéthanol offre une des meilleures solutions de repli puisque son prix est jusqu'à 75 % plus bas que celui des autres carburants. Cependant, un désavantage réside dans une légère surconsommation du véhicule par rapport à l'essence sans plomb. Actuellement, le bioéthanol est présent dans tous les carburants essence distribués en France :

i- à hauteur de 5 % dans le SP95 et le SP98 ;
ii- jusqu'à 10 % dans le SP95-E10 ;
iii- entre 65 % et 85 % dans le Superéthanol E85.

I.5 Principaux modes de production d'éthanol

Selon le procédé de production utilisé, on peut classer l'éthanol selon son origine : non-renouvelable, renouvelable biosourcé de 1ère ou de 2ème génération (Tableau I.2).

Table I.2: Synthèse des différents procédés de production d'éthanol.

Éthanol non renouvelable : **Éthanol synthétique**	Éthanol renouvelable : 1ère **génération**	Éthanol renouvelable : 2ème **génération**
Hydratation de l'éthylène Hydrogénation de l'acide acétique	Produit de plantes sucrières Produit de plantes amylacées	Biomasse lignocellulosique

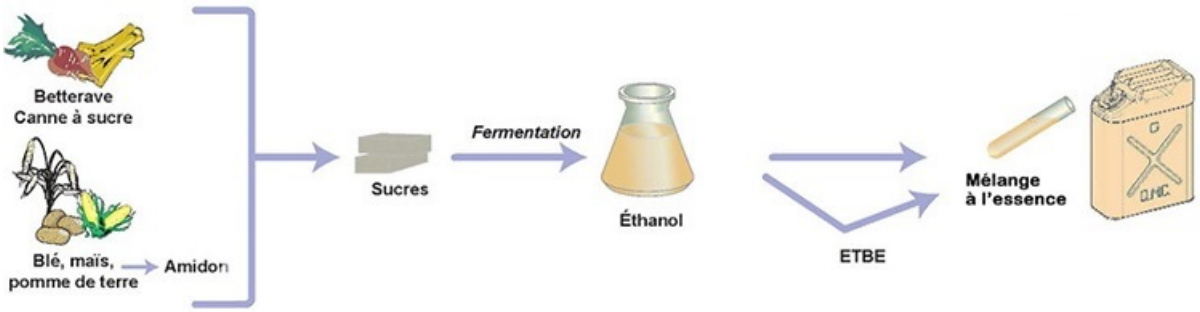
I.5.1 Éthanol non renouvelable : Éthanol synthétique

La production mondiale annuelle d'éthanol est aujourd'hui de 95 Mt selon les derniers chiffres de l' Alternative Fuels Data Center. Cependant, une grande partie de cet éthanol produit dans le monde provient de matières premières fossiles d'origine pétrolière : cet éthanol est qualifié de synthétique. Il est industriellement produit à partir de la pétrochimie par hydratation de l'éthylène, un produit pétrochimique majeur, ou par catalyse acide directe ou indirecte (Tamers; 2006; Heerden et al.; 2002). Environ 60 Mt d'éthanol dérivé du pétrole sont produites chaque année. Les principaux fournisseurs sont l'Afrique du Sud et l'Arabie Saoudite, mais il existe également de grandes usines aux États-Unis, en Europe et au Japon. L'éthanol dérivé du pétrole (éthanol synthétique) est un solvant industriel largement utilisé dans une variété considérable applications. Il existe cependant une autre voie moins utilisée pour produire de l'éthanol synthétique, à savoir l'hydrogénation de l'acide acétique.

I.5.2 Éthanol renouvelable : 1ère génération

L'éthanol peut être produit directement à partir des jus libres de sucre de certaines cultures, en convertissant le saccharose ou les monosaccharides, en particulier le glucose, en éthanol par fermentation grâce à des micro-organismes. Une variété de matières premières telles que les cultures contenant du saccharose (par exemple la canne à sucre ou la betterave à sucre) et les céréales féculentes (par exemple le blé, le maïs et l'orge) sont les bonnes sources de substances riches en sucre pour la production de bioéthanol. Pour produire de l'éthanol à partir d'amidon, il est nécessaire de décomposer sa chaîne glucidique pour obtenir un sirop de glucose, qui peut être transformé en éthanol par les levures selon le schéma illustré sur la Figure I.5. Ce type de matière première est le plus utilisé pour la production d'éthanol en Amérique du Nord et en Europe (Cardona and Sanchez; 2007). Le prétraitement des jus de plantes contenant du sucre consiste principalement en une élimination des impuretés et une désinfection. La solution de sucre est fermentée par la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour produire de l'éthanol qui doit ensuite être purifié par distillation. En ce qui concerne la conception des procédés de production d'éthanol à partir de matières contenant du saccharose, la disponibilité et les coûts de transport de la matière première continuent de jouer un rôle majeur. D'un autre côté, cette base de matières premières ne sera pas totalement durable, car de vastes plantations de maïs destinées à la production d'éthanol entreront en concurrence pour les terres arables limitées, ce qui pourrait entraîner une crise alimentaire (Binod et al.; 2010; Galbe and Zacchi; 2007). Aux États-Unis et dans le monde, la matière première de base pour l'éthanol est constituée de céréales secondaires

(maïs). Toutefois, la production d'éthanol à partir de ces aliments a plafonné en 2015. L'augmentation de la production d'éthanol au cours des 10 prochaines années devrait donc résulter de l'éthanol issu de plantes sucrières (canne, betterave).



Source : IFPEN (2017)

FIGURE I.5: Description synthétique de la voie de production de bioéthanol de première génération.

La canne à sucre est l'une des cultures les plus abondantes au monde. C'est une plante polyvalente cultivée pour la production de sucre et son principal sous-produit est la bagasse. La bagasse est le résidu obtenu après mouture de la canne à sucre pour l'extraction du jus. Dans la production de canne à sucre, la bagasse extraite des cultures représente environ 27 à 28 % en poids sec de la biomasse végétale. Il s'agit d'un matériau très hétérogène composé de 20 à 30 % de lignine, de 40 à 45% de cellulose et de 30 à 35 % d'hémicellulose, avec des quantités limitées d'extractibles et de cendres. Sa composition en fait une matière première prometteuse pour la production de biocarburants de deuxième génération (Cardona et al.; 2010).

I.5.3 Éthanol renouvelable : 2ème génération

Le bioéthanol de deuxième génération est produit à partir de ressources renouvelables non alimentaires notamment de la BLC. Le terme "lignocellulosique" couvre une gamme de molécules végétales/biomasse contenant de la cellulose, avec des quantités variables de lignine, ainsi qu'une longueur de chaîne et un degré de polymérisation différents. Les matériaux lignocellulosiques ont le potentiel d'être utilisés comme matière première pour les biocarburants diesel avancés (par conversion thermochimique) et pour la production d'éthanol cellulosique (par conversion biochimique) selon la Figure I.6. Les biopolymères lignocellulosiques extraits du bois et des plantes, généralement la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, ont été reconnus comme les ressources alternatives les plus abondantes et qui présentent le meilleur potentiel pour la production de bioéthanol et d'autres produits à valeur ajoutée (Kumar et al.; 2009; Rubin; 2008). Les biomasses lignocellulosiques telles que les résidus agricoles, le bois et les déchets de bois sont principalement composées de cellulose (45–56 %) qui est un homopolymère du glucose, d'hémicelluloses (10–25 %), hétéropolymère plus complexe contenant principalement du xylose (mais également des quantités importantes d'arabinose, mannose, glucose et galactose), ainsi que de lignine (18–30

%) (Guerriero et al.; 2015; Kang et al.; 2019; Menon and Rao; 2012). Des quantités infimes d'autres composants, tels que des groupes acétyle, des minéraux et des substituants phénoliques sont également présents. La composition de ces constituants peut varier d'une espèce de plante à l'autre. Les polysaccharides des parois cellulaires de la BLC sont composés de fibrilles de cellulose cristalline entourées d'une matrice d'hémicellulose non cristalline, qui forment un groupe d'hétéropolysaccharides qui se lient à la cellulose ou à la pectine, formant ainsi un réseau de fibres réticulées (Ramos; 2003). La biomasse lignocellulosique semble être une matière première intéressante pour trois raisons principales. Premièrement, elle constitue une ressource renouvelable de manière durable dans le futur. Deuxièmement, elle semble avoir d'excellentes propriétés environnementales puisque sa transformation ne génère pas de rejet important de dioxyde de carbone ou de soufre. Troisièmement, elle pourrait avoir un potentiel économique important à condition que les prix des combustibles fossiles augmentent (Demirbas; 2008). En outre, les matériaux lignocellulosiques n'ont pas d'effet négatif sur la chaîne d'approvisionnement alimentaire humaine ou animale en éliminant les aliments au profit de la production de bioéthanol (Alvira et al.; 2010).

Les biomasses lignocellulosiques ne se décomposent pas facilement en molécules de sucres simples

Source : IFPEN

FIGURE I.6: Classification des différentes voies d'obtention du bioéthanol de 2ème génération.

car elles résistent aux attaques enzymatiques en raison de leur structure imperméable. Trois étapes sont nécessaires au traitement de la BLC en éthanol, à savoir le prétraitement, l'hydrolyse et la fermentation. Divers paramètres, tels que le degré de rupture de la structure complexe de la lignocellulose, la charge enzymatique, ou l'interférence des inhibiteurs pendant l'hydrolyse et la fermentation, doivent nécessairement être pris en compte lors du procédé de bioconversion. Le prétraitement est considéré comme l'une des étapes de traitement les plus coûteuses dans la conversion de la cellulose en sucres fermentescibles. Il présente également un fort potentiel d'amélioration de l'efficacité et de réduction des coûts accessible grâce à la recherche et au développement (Alvira et al.; 2010; Taherzadeh and Karimi; 2008).

I.6 La biomasse lignocellulosique, matière première pour le bioéthanol

I.6.1 Structure de la biomasse lignocellulosique

Les principaux composants des matériaux lignocellulosiques sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

La cellulose est un composant structurel majeur des parois cellulaires qui procure une résistance mécanique et une stabilité chimique aux plantes. L'énergie solaire est absorbée au cours du processus de la photosynthèse et stockée sous forme de cellulose. Les hémicelluloses sont des copolymères de différents types de C5 et C6 qui existent également dans la paroi cellulaire de la plante (Kang et al.; 2019). La lignine est un polymère de composés aromatiques qui forme une couche protectrice pour les parois de la plante. Dans la nature, ces substances se développent et se dégradent au cours de l'année. On estime qu'environ $7{,}5.10^{10}$ tonnes de cellulose sont consommées et régénérées chaque année (Kirk-Othmer; 2001). C'est donc le composé organique le plus abondant au monde.

Outre les trois composés chimiques principaux constituant la lignocellulose, l'eau est également présente dans le complexe. De plus, des quantités mineures de protéines, de minéraux et d'autres composants peuvent également être trouvées dans la composition de la BLC. La composition de la lignocellulose dépend fortement de sa source. Il existe une variation significative de la teneur en lignine et hémicellulose de la lignocellulose selon qu'elle provient de bois des feuillus, de bois des résineux ou de graminées (Tableau I.3). La Figure I.7 illustre la structure de la lignocellulose.

Table I.3: Teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine de diverses biomasses lignocellulosiques.

BLC	Lignine %	Hémicellulose (%)	Cellulose (%)	Références
Feuillus	18-25	24-40	40-55	Malherbe and Cloete (2002)
Résineux	25-35	25-35	45-50	Malherbe and Cloete (2002)
Sorgho sucré	21	27	45	Kim and Day (2011)
Paille de riz	9,8 ± 5,5	26,7 ± 4.9	35,3 ± 4.5	Godin et al. (2010)
Rafles de maïs	15	35	45	Prasad et al. (2007)
Paille de blé	16-21	26-32	29-35	Malherbe and Cloete (2002)
Bagasse	23,33	16,52	54,87	Guimarães et al. (2009)
Résidus de banane	14	14,8	13,2	Sánchez-Acuña et al. (2018)
Coque de cacahuètes	16	36	38	Nyachaka et al. (2013)
Miscanthus	20,4 ± 4,8	25,4 ±2,2	44,0 ± 4,8	Godin et al. (2010)
Fibre de maïs	7,3 ± 1,6	27,4 ± 1,2	38 ± 3,8	Godin et al. (2010)
Ecorce de pin maritime	44	15	24	Fradinho et al. (2002)

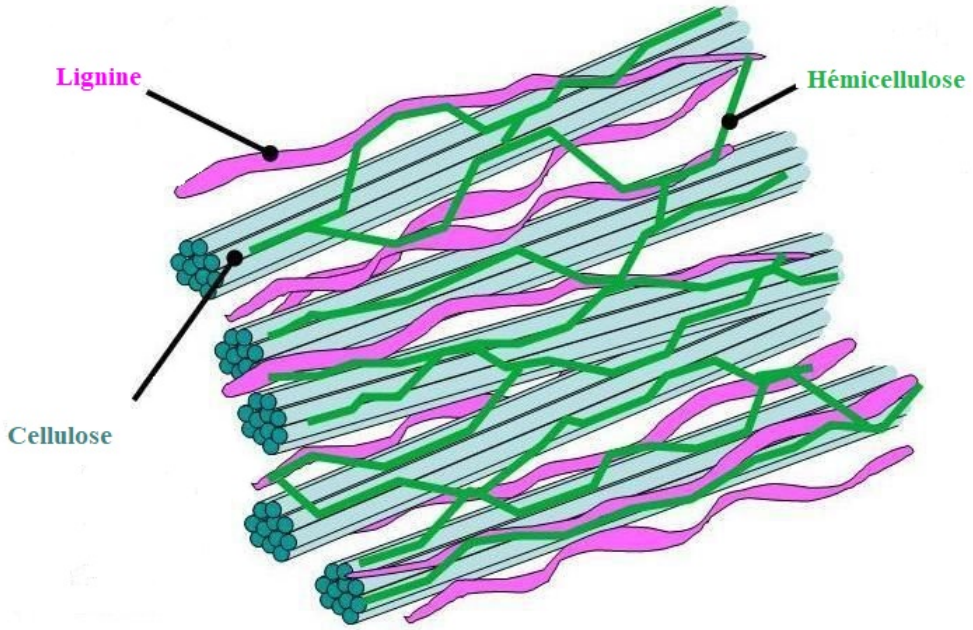


FIGURE I.7: Structure de la paroi cellulaire de la biomasse lignocellulosique.

I.6.2 Cellulose

Le composant principal de la biomasse lignocellulosique est la cellulose. La cellulose est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités de glucose (D-glucopyranose) liées entre elles par des liaisons β (1-4) glycosidiques (β-D-glucane) décrites sur la Figure I.8. L'unité récurrente de la cellulose est le disaccharide cellobiose. La nature hydrophile/hydrophobe de la cellulose repose sur son anisotropie structurelle. Les chaînes de cellulose sont disposées de manière parallèle et sont organisées en feuilles stabilisées par des liaisons hydrogène O$\cdots$H à 0 intercalaire, tandis que l'empilement de feuilles est stabilisé par les forces de dispersion de Van der Waals et par de faibles liaisons hydrogène CH$\cdots$O. La cellulose a une forte affinité pour elle-même et pour les matériaux contenant des hydroxyles, en particulier l'eau. Basé sur la prépondérance de fonctions hydroxyle, le polymère de cellulose est très réactif avec l'eau. La petitesse moléculaire de l'eau favorise la réaction avec les chaînes de cellulose et des liaisons hydrogène sont immédiatement formées. De plus, les forces de dispersion de Van der Waals jouent un rôle important entre ces deux entités réactives. Elles stabilisent la structure de la cellulose et donnent une énergie de cohésion considérable au réseau de cellulose. En résumé, les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques et les forces de dispersion de Van der Waals jouent un rôle important dans la détermination de la structure cristalline de la cellulose lors des interactions cellulose-eau (Ha et al.; 1998; Somerville et al.; 2010).

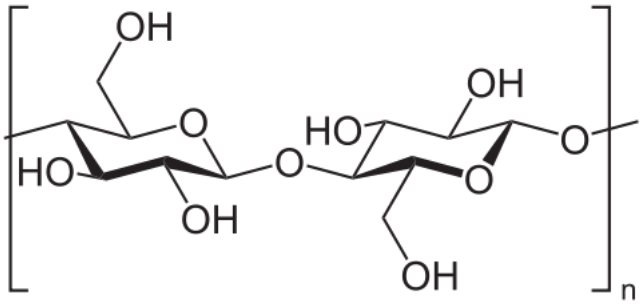


FIGURE I.8: Structure chimique de la cellulose.

I.6.3 Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides ramifiés peu polymérisés et constitués de différentes unités monosaccharidiques telles que le glucose, le mannose, le galactose, l'arabinose et le xylose (Figure I.9). Elles ont des ramifications courtes (∼50-200) et amorphes, ce qui les rend partiellement solubles dans l'eau (Demirbas; 2008). Les hémicelluloses sont capables de se lier à la cellulose par de multiples liaisons par pont hydrogène et à la lignine par des liaisons covalentes. Ces polymères ne sont pas cristallins et sont plus accessibles à l'hydrolyse que la cellulose. Les hémicelluloses présentent une structure en bâtonnets avec des ramifications et des chaînes latérales repliées dans la chaîne principale par liaison hydrogène.

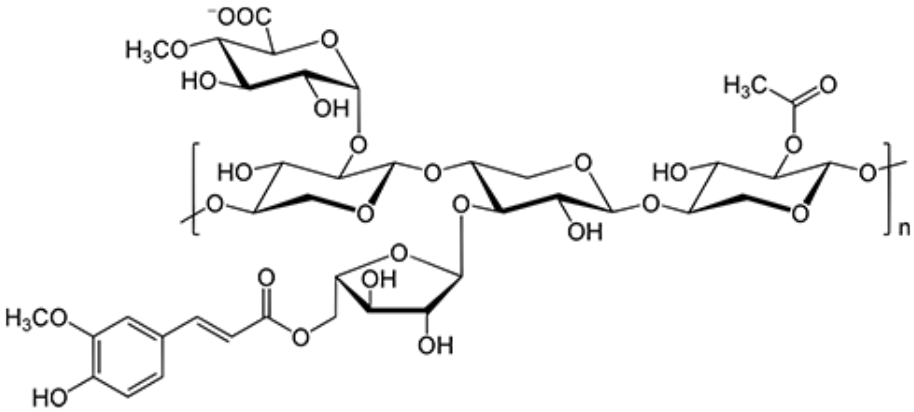


FIGURE I.9: Structure chimique de l'hémicellulose.

I.6.4 Lignine

Après la cellulose, la lignine est la deuxième source de carbone renouvelable la plus abondante. La lignine est un hétéropolymère phénolique réticulé dérivé principalement de trois monomères d'alcool hydroxycinnamoyle, à savoir les alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique. Ils sont principalement formés par la polymérisation radicalaire d'unités alcool p-hydroxy cinnamylique à teneur en méthoxy variable (Figure I.10). Ils sont de nature relativement hydrophobe et aromatique. Selon le degré de méthoxylation, le groupe aromatique est le p-hydroxybenzyle (dérivé de l'alcool p-coumarylique), le guaïacyle (dérivé de l'alcool conifery-

lique) ou le syringyle (dérivé de l'alcool sinapylique) (Ramos; 2003). La lignine non seulement donne de la résistance au tissu végétal en raison de sa rigidité, mais elle affecte également le transport de l'eau, des nutriments et des métabolites. La teneur en lignine dans la biomasse

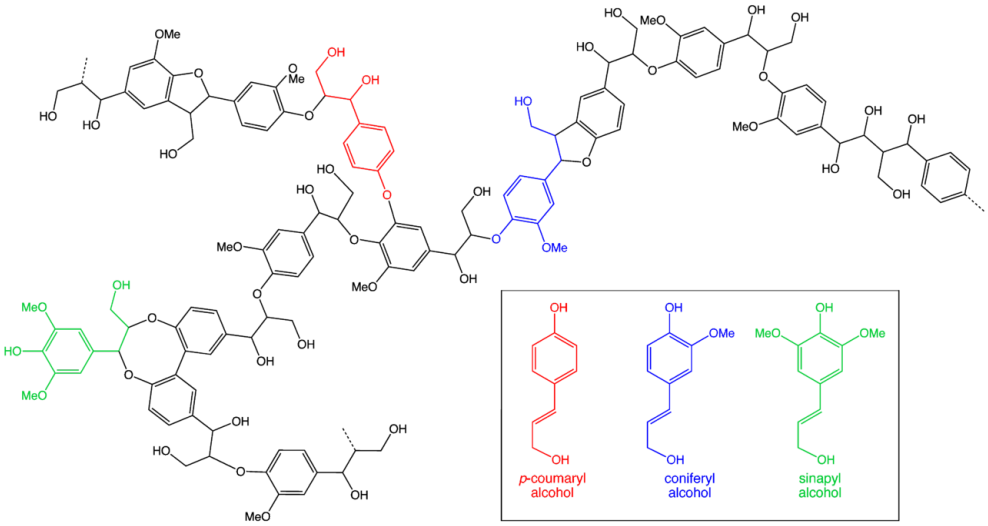


FIGURE I.10: Structure chimique de la lignine.

lignocellulosique peut fortement varier selon que l'on considère des feuillus, des résineux ou des herbacés, comme cela a déjà été illustré par le Tableau I.3 (Shahzadi et al.; 2014; Cai et al.; 2017).

I.6.5 Les extractibles

Les extractibles sont des molécules de poids moléculaire moyen ou faible qui peuvent être retirées des cellules végétales par extraction au solvant sans affecter la structure cellulaire du matériau ni ses propriétés mécaniques. Dans l'extraction du bois, les matières extractibles représentent une faible proportion du matériau, généralement moins de 10 %. Les substances extractibles peuvent inclure des centaines de molécules différentes qui peuvent être classées de différentes manières, par exemple en fonction de leur polarité ou du solvant dans lequel elles sont solubilisées, ou organisées en familles de produits chimiques. A titre d'exemple, les extraits du liège comprennent les n-alcanes, les n-alcanols, les cires, les triterpènes, les acides gras, les glycérides, les stérols, les phénols et les polyphénols. Ils sont généralement classés en deux groupes : les aliphatiques solubilisés dans des solvants de faible polarité (par exemple, l'hexane, le dichlorométhane, le chloroforme) et les composés phénoliques extraits par des solvants polaires (par exemple, l'éthanol et l'eau).

I.7 Prétraitement de la biomasse lignocellulosique

Le prétraitement est une étape importante nécessaire pour décomposer la structure de la lignine et des hémicelluloses, réduire la cristallinité et augmenter la porosité de la cellulose afin de la rendre accessible aux enzymes ou aux acides et permettre ainsi son hydrolyse. Une clas-

sification approximative du prétraitement basée sur le pH le divise en prétraitements acides, alcalins et neutres (Galbe and Zacchi; 2007). Cette classification est axée uniquement sur le prétraitement chimique. Elle n'englobe pas les autres méthodes de prétraitement telles que les prétraitements physiques ou biologiques. Une classification généralisée des méthodes de prétraitement les regroupe en : prétraitements physique, chimique, biologique et multiple ou hybride, comme illustré sur la Figure I.11. Dans les méthodes de prétraitements hybrides, des paramètres physiques tels que la température ou la pression, ou encore une étape biologique sont combinés à des traitements chimiques et sont alors appelés méthodes de prétraitements physico-chimiques ou biochimiques d'une façon générale. L'AFEX (Ammonia Fiber Explosion) est un bon exemple de méthode physico-chimique (Sun and Cheng; 2002), et le traitement Bioorganosolv constitue aussi un exemple typique de méthode biochimique pour le prétraitement de la biomasse (Itoh et al.; 2003). Les stratégies de prétraitements hybrides sont généralement plus efficaces pour améliorer la digestibilité de la biomasse et sont souvent utilisées pour concevoir des technologies de prétraitement avancées. Un prétraitement efficace devrait améliorer la conversion des sucres.

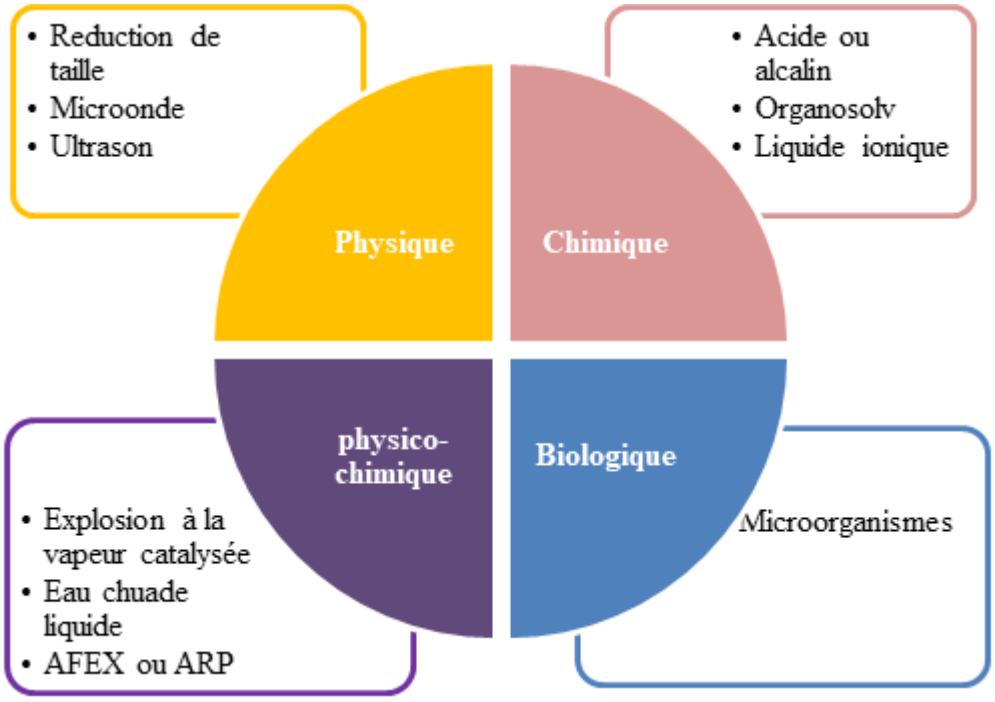


FIGURE I.11: Classification des différentes classes de prétraitements de la BLC.

Il devrait également éviter la dégradation ou la perte de glucides, ainsi que la formation de sous-produits qui inhibent l'hydrolyse et le processus de fermentation. Il devrait de plus être rentable et externaliser la demande en énergie. Les obstacles dus au coût de l'utilisation de la biomasse peuvent être surmontés en développant une méthode de prétraitement efficace avec des conditions de fonctionnement optimales. La formation limitée d'inhibiteurs, la préservation de la cellulose et des hémicelluloses, la réduction de l'utilisation de produits chimiques et d'eau, la réduction de la demande en énergie dans les procédés biochimiques sont les éléments clés d'un prétraitement économique. Les points énumérés sont résumés dans le tableau I.4.

Table I.4: Facteurs clés pour un prétraitement efficace de la biomasse lignocellulosique.

1	Rendements élevés de multiples cultures, âges des sites et périodes de récolte
2	Fraction solide hautement digestible
3	Pas de dégradation du sucre
4	Faible quantité de composés toxiques
5	Pas d'exigence de réduction de taille
6	Exploitation dans des réacteurs de taille raisonnable et à coût modéré
7	Non production de résidus de déchets solides
8	Efficacité à faible teneur en humidité
9	Obtention d'une concentration en sucre élevée
10	Compatibilité de fermentation du matériau de prétraitement
11	Récupération de la lignine
12	Consommation minimale de chaleur et de puissance

I.7.1 Prétraitement physique : comminution

La fragmentation, le déchiquetage, le broyage font partie des différentes méthodes mécaniques de réduction de taille qui sont utilisées pour améliorer la digestibilité de la biomasse lignocellulosique (Palmowski and Müller; 1999). Ces traitements augmentent la surface spécifique disponible et réduisent à la fois le degré de polymérisation (DP) et la cristallinité de la cellulose (Sun and Cheng; 2002). La récolte et le pré-conditionnement réduisent la BLC des grumes à des tailles grossières d'environ 10–50 mm, l'écaillage réduit la taille de la biomasse à 10–30 mm tandis que le broyage et le déchiquetage peuvent réduire la taille des particules à 0,2–2 mm. Cependant, il a été démontré qu'une réduction supplémentaire de la taille des particules de biomasse en-dessous de 40 mesh (0,4 mm) avait peu d'effet sur les taux et les rendements d'hydrolyse de la biomasse (Chang et al.; 1997). L'objectif du broyage est de réduire les limitations de transfert de chaleur et de masse. Le broyage et le déchiquetage sont plus efficaces pour réduire la taille des particules et la cristallinité de la cellulose que l'écaillage, probablement du fait des forces de cisaillement générées lors du broyage. Le type et la durée de broyage ainsi que le type de biomasse déterminent l'augmentation de la surface spécifique, le DP final et la réduction nette de la cristallinité de la cellulose. Le broyage à billes vibratoire est plus efficace que le broyage à billes ordinaire pour réduire la cristallinité de la cellulose dans les copeaux d'épicéa et de tremble. Le broyage à disque qui produit des fibres améliore plus efficacement l'hydrolyse de la cellulose que le broyage à marteaux qui produit des faisceaux plus fins (Zhua et al.; 2009). Les besoins en énergie de la fragmentation mécanique de la biomasse lignocellulosique dépendent à la fois des caractéristiques de la biomasse et de la taille de particule finale requise. Les feuillus nécessitent plus d'énergie que les résidus agricoles pour un résultat similaire (Cadoche and López; 1989). La réduction de taille est utilisée dans la plupart des études de recherche sur l'hydrolyse, mais avec peu d'informations fournies sur les caractéristiques du substrat et de l'énergie consommée au cours du processus (Nguyen; 2000; Zhu et al.; 2005). Des études ont montré que le broyage augmente les rendements en biogaz, bioéthanol et biohydrogène (Delgenes et al.; 2003). Compte-tenu des besoins énergétiques élevés de ce procédé à

l'échelle industrielle et de la hausse de la demande énergétique, il est peu probable qu'il reste économiquement viable (Hendriks and Zeeman; 2009). Cependant, étant donné que le broyage peut être effectué avant ou après le prétraitement chimique, des études récentes montrent que le broyage après le prétraitement chimique réduira considérablement :

i- la consommation d'énergie de broyage,

ii- le coût de la séparation solide-liquide car les copeaux prétraités peuvent être facilement séparés,

iii- les besoins en mélange à forte intensité énergétique des suspensions de prétraitement,

iv- le rapport liquide-solide,

v- la production d'inhibiteurs de fermentation (Zhua et al.; 2009; Zhu et al.; 2010).

D'autres formes de prétraitement physique suggérées impliquent l'utilisation de rayons γ (Takács et al.; 2000) qui clivent les liaisons β $-1{,}4$ glycosidiques, permettant d'obtenir une surface plus grande et une cristallinité inférieure. Cette méthode serait sans aucun doute très coûteuse à grande échelle et poserait d'énormes problèmes d'environnement et de sécurité.

I.7.2 Prétraitement biologique

Le traitement biologique comparé aux méthodes conventionnelles telles que les prétraitements chimiques et physiques est considéré comme un processus efficace, à faible consommation d'énergie et respectueux de l'environnement. Cette méthode utilise principalement des micro-organismes, tels que des champignons ou des bactéries, qui sont capables de se reproduire tout en dégradant la BLC. Les prétraitements biologiques sont principalement associés à l'action de champignons producteurs d'enzymes capables de dégrader la lignine, l'hémicellulose et les polyphénols. Il a été rapporté que les champignons de la pourriture blanche et de la pourriture molle dégradent les matières lignocellulosiques, la pourriture blanche étant le traitement de prétraitement biologique de la biomasse le plus efficace (Lee; 1997). Les champignons de la pourriture brune attaquent principalement la cellulose, tandis que la pourriture blanche et la pourriture douce attaquent à la fois la lignine et la cellulose via la production d'enzymes telles que les peroxydases de lignine, les polyphénol oxydases, les peroxydases dépendantes du manganèse et les laccases qui dégradent la lignine. Hatakka (1994) et Vares et al. (1993) ont signalé la délignification sélective du bois et de la paille de blé par certains champignons responsables de la pourriture blanche, tels que *Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Dichmitus squalens, Rigidosporus lignosus* et *Jungua separabilima.* La dépolymérisation de la lignine par ces champignons prend des semaines pour atteindre des résultats significatifs, mais peut être très sélective et efficace (Hatakka; 1994; Vares et al.; 1993). La cinétique de prétraitement biologique est cependant trop lente pour des applications industrielles. Le temps de séjour de 10 à 14 jours, l'exigence de conditions de croissance et le grand espace nécessaire pour effectuer les prétraitements biologiques sont les inconvénients qui rendent cette méthode de prétraitement peu attrayante à l'échelle industrielle. Le fait qu'une partie de la fraction glucidique soit consommée par le micro-organisme constitue également un inconvénient. Le prétraitement biologique

pourrait être exploité comme première étape du prétraitement en combinaison avec une méthode additionnelle, ou seul si la biomasse a une faible teneur en lignine. Par ailleurs, en analysant l'impact du prétraitement biologique avec des champignons de la pourriture blanche dans un prétraitement combiné du hêtre, Itoh et al. (2003) ont déclaré qu'un prétraitement biologique permettait d'économiser 15 % de l'électricité nécessaire à l'éthanolyse du bois de hêtre soumis à un prétraitement Bioorganosolv (Itoh et al.; 2003).

I.7.3 Prétraitement physico-chimique

Cette catégorie comprend la grande majorité des technologies de prétraitement, telles que le prétraitement à la vapeur (ou explosion à la vapeur), le prétraitement à l'eau chaude, le prétraitement par oxydation humide, l'explosion à l'ammoniac (AFEX), le recyclage par percolation de l'ammoniac, ou le prétraitement à l'ammoniac aqueux.

I.7.3.1 Prétraitement à la vapeur (PV)

Le prétraitement à la vapeur (également appelé explosion à la vapeur) est la méthode physico-chimique la plus étudiée et la plus couramment appliquée pour le prétraitement de la BLC. Le PV était auparavant appelé explosion à la vapeur, car on pensait qu'une action « explosive » sur les fibres était nécessaire pour qu'elles deviennent hydrolysables. Le terme « auto-hydrolyse » a également été utilisé comme synonyme de PV, décrivant les changements survenant au cours du PV (Chandra et al.; 2007; McMillan; 1994). Dans ce processus, la biomasse prétraitée physiquement (déchiquetée, moulue ou simplement préconditionnée brute) est généralement traitée avec de la vapeur saturée à haute pression à des températures d'environ 160 à 240 °C et à des pressions comprises entre 0,7 et 4,8 MPa. La pression est maintenue pendant quelques secondes à quelques minutes pour favoriser l'hydrolyse de l'hémicellulose, puis relâchée. L'hémicellulose est la fraction prédominante des glucides solubilisés dans la phase liquide pendant le prétraitement, tandis que la lignine est transformée du fait de la température élevée. La cellulose de la fraction solide devient plus accessible, ce qui augmente la digestibilité de la matière première lignocellulosique. On pense que l'hydrolyse de l'hémicellulose est provoquée par l'acide acétique généré par les groupes acétyle associés à l'hémicellulose et d'autres acides libérés pendant le prétraitement, qui peuvent catalyser davantage l'hydrolyse de l'hémicellulose, ce qui entraîne la libération de monomères de glucose et de xylose, d'où l'utilisation du terme auto-hydrolyse (Mosier et al.; 2005; Weil et al.; 1998). À haute sévérité (270 °C, 1 min), le PV donne une solubilisation optimale de l'hémicellulose, mais une température plus basse et un temps de séjour plus long (190 °C, 10 min) sont plus favorables car ils évitent la formation de produits de dégradation du sucre qui inhibent la fermentation ultérieure (Wright; 1988). L'efficacité du PV peut être améliorée par addition de H_2SO_4, CO_2 ou SO_2 en tant que catalyseur. L'utilisation d'un catalyseur acide augmente la récupération des sucres d'hémicellulose, diminue la production de composés inhibiteurs et améliore l'hydrolyse enzymatique sur le résidu solide (Mosier et al.; 2005; Sun and Cheng; 2002).

I.7.3.2 Explosion à l'ammoniac (AFEX)

Dans le prétraitement AFEX, la biomasse est mise en contact avec une charge d'ammoniac liquide anhydre dans un rapport de 1/1 à 2/1 (1 à 2 kg d'ammoniac/kg de biomasse sèche) pendant 10 à 60 min à 60–90 °C et à des pressions supérieures à 3 MPa. Dans un récipient fermé sous pression, le mélange de biomasse et d'ammoniac est chauffé pendant environ 30 minutes à la température souhaitée. Après avoir maintenu la température cible pendant environ 5 minutes, la soupape d'aération est ouverte rapidement pour relâcher la pression de manière explosive. La libération rapide provoque une évaporation de l'ammoniac (qui est volatil à la pression atmosphérique) et une baisse concomitante de la température du système (Alizadeh et al.; 2005; Kim et al.; 2000). L'effet chimique de l'ammoniac sous pression fait gonfler la biomasse cellulosique, augmentant ainsi la surface accessible tout en décristallisant la cellulose. Cela entraîne un changement de phase dans la structure cristalline de la cellulose (Mosier et al.; 2005; O'sulivan; 1997). Une petite quantité d'hémicellulose est solubilisée sous forme oligomère lors du prétraitement par AFEX. La distribution de la lignine dans la biomasse reste relativement la même après le prétraitement AFEX, mais la structure de la lignine est fortement modifiée, ce qui augmente la capacité de rétention d'eau et la digestibilité. Les modifications physiques et chimiques combinées augmentent nettement la sensibilité de la BLC prétraitée à une hydrolyse enzymatique ultérieure (Dale and Moreira; 1982; Galbe and Zacchi; 2007; Kim et al.; 2009). Les conditions de procédé douces (température $<$ 100 °C et pH $<$12) minimisent la formation de produits de dégradation du sucre et d'inhibiteurs de fermentation. Il est bien établi que le prétraitement AFEX peut améliorer de manière significative les taux de saccharification des plantes herbacées, des résidus agricoles et des déchets urbains solides. Par exemple un taux d'hydrolyse proche de 90 % a été atteint sur de l'herbe côtière des Bermudes prétraitée par AFEX (Holtzapple et al.; 1992; Vlasenko et al.; 1997).

I.7.3.3 Prétraitement par voie hydrothermale

Solvolyse, hydrothermolyse, fractionnement en phase aqueuse et aquasolv sont tous des termes utilisés pour décrire l'utilisation de l'eau chaude en phase liquide pour le prétraitement de la BLC. Le prétraitement par voie hydrothermale est similaire au PV, mais utilise de l'eau à l'état liquide à des températures élevées au lieu de la vapeur. Ainsi il entraîne l'hydrolyse de l'hémicellulose et l'élimination de la lignine, rendant la cellulose de la biomasse plus accessible, tout en évitant la formation d'inhibiteurs de fermentation qui se produisent à des températures plus élevées (Yang and Wyman; 2004). Dans ce processus, des températures plus basses (optimum entre 180 et 190 °C pour les tiges de maïs) et une faible teneur en matière sèche (environ 1 à 8%) sont utilisées, ce qui entraîne une production accrue de poly et d'oligosaccharides. Des températures de 160–190 °C pour le prétraitement à l'eau liquide chaude à pH contrôlé et de 170–230 °C ont été rapportées en fonction de la gravité du prétraitement (Bobleter; 1994; Wyman et al.; 2005). En fonction du sens de l'écoulement de l'eau et de la biomasse dans le réacteur, le prétraitement des déchets faiblement chauffés a été effectué dans trois types de configurations

de réacteur ; co-courant, contre-courant et configuration traversante du réacteur. L'eau et la biomasse sont mises en contact pendant 15 minutes à des températures comprises entre 200 et 230 °C. L'eau chaude coupe les liaisons hémi-cétaliques, libérant ainsi des acides lors de l'hydrolyse, ce qui facilite la rupture des liaisons éther dans la biomasse. La formation de monosaccharides et les produits de dégradation ultérieurs qui catalysent en outre l'hydrolyse de la matière cellulosique pendant le prétraitement des déchets de faible consommation peuvent être minimisés en maintenant le pH entre 4 et 7 (Kohlmann et al.; 1995).
Yang and Wyman (2004) considèrent que la configuration la plus efficace pour éliminer l'hémicellulose et la lignine à la même sévérité est la configuration du réacteur dans laquelle de l'eau chaude passe sur un lit fixe de lignocellulose. Une solubilisation élevée en lignine empêche le récupération de l'hémicellulose (Mok and Antal; 1993, 1992). Un catalyseur tel qu'un acide peut être ajouté, ce qui rend le processus similaire au prétraitement à l'acide dilué. Cependant, la dégradation catalytique des sucres conduit à des produits secondaires indésirables.

I.7.4 Prétraitement chimique

Certains produits chimiques tels que les acides, les alcalis, les solvants organiques et les liquides ioniques ont des effets importants sur la structure native de la biomasse lignocellulosique (Fengel and Wegener; 2011).

I.7.4.1 Prétraitement à acide dilué

Une suspension aqueuse de substrat lignocellulosique est chauffée à la température souhaitée et prétraitée à l'acide sulfurique préchauffé (concentrations <4% en poids) dans un réacteur en acier inoxydable (Esteghlalian et al.; 1997; Torget et al.; 1992). Dans ce cas, le prétraitement à l'acide dilué (AD) commence lors de l'ajout de l'acide. Le prétraitement AD est effectué à une température comprise entre 140 et 215 °C. Le temps de séjour varie de quelques secondes à quelques minutes en fonction de la température du prétraitement. Dans un autre procédé, une biomasse préconditionnée et physiquement prétraitée dans un treillis métallique est immergée dans un bain circulant d'acide sulfurique dilué. Le bain est ensuite chauffé aux températures souhaitées pour effectuer un prétraitement à différentes sévérités (basse température, faible concentration d'acide). Nguyen (2000) a signalé un prétraitement à l'acide dilué en deux étapes visant à maximiser la récupération du sucre et à améliorer la digestibilité de la biomasse. Un prétraitement à l'AD de faible sévérité a été utilisé dans la première étape pour favoriser l'hydrolyse/la récupération de l'hémicellulose et une seconde étape de forte sévérité a été utilisée pour hydrolyser une partie de la cellulose restante en glucose (Nguyen; 2000). Lors de ce prétraitement, l'action de l'acide sur la BLC libère des oligomères et des sucres monomères en affectant la réactivité des polymères de glucides de la biomasse. En fonction de la gravité combinée du prétraitement, les sucres peuvent être convertis en aldéhydes tels que le furfural et le 5-HMF. Dans un processus de prétraitement en flux continu, la biomasse est mélangée ou mise en contact avec de l'acide sulfurique dilué à moins de 0,1 % pour hydrolyser l'hémicellulose dans la biomasse,

contre 0,6 à 3,0 % pour le AD. Un rendement en glucose supérieur à 80 % pour un équivalent en acide sulfurique de 0,05 % en poids a aussi été rapporté (Mok and Antal; 1992).

I.7.4.2 Prétraitement à la chaux et prétraitement par oxydation humide

Le prétraitement à la chaux (PC) est un prétraitement physico-chimique alcalin à faible coût qui améliore la digestibilité de la biomasse lignocellulosique (Chang et al.; 1998). Le prétraitement utilise une solution aqueuse de $Ca(OH)_2$ à basse température et basse pression pour solubiliser l'hémicellulose et la lignine (Chang et al.; 1998). En utilisant 0,1 g de $Ca(OH)_2$/g de biomasse, le PC peut être conduit dans une large plage de températures allant de 25 à 130 °C. À la température ambiante (25 °C), le PC peut prendre des semaines et à haute température (120 °C), 2 heures seulement sont nécessaires pour le prétraitement du *Panicum virgatum*, solubilisant 26 % de xylane et 29 à 33 % de lignine (Chang et al.; 1998).

Un prétraitement par oxydation humide implique l'ajout d'un agent oxydant tel que l'oxygène, l'eau ou le peroxyde d'hydrogène à la biomasse en suspension dans un liquide pour améliorer l'élimination de l'hémicellulose et de la lignine. Ainsi, un PC de paille de blé à 85 °C pendant 3 h (Chang et al.; 1998) et de bois de peuplier à 150 °C pendant 6 h avec de l'oxygène à 14 atm (Chang et al.; 2001) ont donné un meilleur rendement que sans oxygène.

I.7.4.3 Prétraitement à l'explosion au dioxyde de carbone (CO_2)

L'explosion au CO_2 (PEDC) implique l'utilisation de CO_2 supercritique (SC–CO_2) sous pression pour améliorer la digestibilité de la BLC. Dans ce processus, le SC–CO_2 est acheminé vers la biomasse placée dans un récipient à basse pression (Kim and Hong; 2001) ou livré à haute pression (1000–4000 psi) (Zheng et al.; 1995). Le récipient est chauffé à la température souhaitée et maintenu pendant une durée déterminée, généralement plusieurs minutes lorsque le procédé est conduit à des températures élevées pouvant atteindre 200 °C (Hendriks and Zeeman; 2009). Le CO_2 pénètre dans la biomasse à haute pression et on pense qu'une fois dissous dans l'eau, le CO_2 forme de l'acide carbonique qui contribue à l'hydrolyse de l'hémicellulose. La libération du gaz sous pression entraîne une perturbation de la structure naturelle de la biomasse, ce qui augmente la surface accessible (Zheng et al.; 1995). Le prétraitement à l'explosion au dioxyde de carbone n'est pas efficace sur la biomasse sèche, mais il augmente le rendement hydrolytique de la biomasse humide, en proportion de la teneur en humidité de la matière première non transformée (Kim and Hong; 2001). Le faible coût du dioxyde de carbone en tant qu'agent de prétraitement, l'absence de génération de toxines, l'utilisation de basses températures et une grande teneur en solides sont les caractéristiques les plus intéressantes du PEDC. Cependant, le coût élevé des équipements pouvant résister aux conditions de pression élevées du PEDC constitue une limite importante à l'application de ce procédé à grande échelle. De plus, les effets sur les composants glucidiques de la biomasse doivent encore être élucidés.

I.7.4.4 Prétraitement aux liquides ioniques

Une nouvelle approche du prétraitement chimique de la biomasse consiste à utiliser des liquides ioniques (ILs). Les ILs sont une nouvelle classe de solvants à bas point de fusion (<100 °C), de forte polarité, avec une bonne stabilité thermique et une pression de vapeur négligeable, entièrement constitués d'ions (cations et anions) (Wasserscheid and Keim; 2000; Zavrel et al.; 2009). La plupart des ILs utilisés dans le fractionnement de la biomasse sont des sels d'imidazonium. Des études montrent que le chlorure de 1-allyl-3-méthylimidazonium (AMIMCl) et le chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazonium (BMIMCl) peuvent être utilisés efficacement comme solvant non-dérivatisant pour la dissolution de la cellulose à des températures inférieures à 100 °C (Zhang and Lynd; 2006; Zhu et al.; 2006). Un mécanisme de dissolution possible suggère que ces liquides ioniques entrent en concurrence avec les composants lignocellulosiques (Zavrel et al.; 2009) pour la liaison hydrogène, perturbant ainsi son réseau tridimensionnel (Moulthrop et al.; 2005). La fraction de cellulose peut être récupérée par addition d'eau, d'éthanol ou d'acétone. Le solvant peut être récupéré et réutilisé par divers procédés tels que la pervaporation, l'osmose inverse, le relargage et l'échange ionique. Le potentiel d'amélioration de la digestibilité de la BLC par les ILs n'est pas encore complètement élucidé (Zavrel et al.; 2009). En général, les ILs sont considérées comme respectueux de l'environnement (Pu et al.; 2007), dissolvants monocomposant non cellulitants, non volatils, thermostables, avec des applications potentielles pour le fractionnement et la dissolution de la cellulose. Cependant, les détails du traitement de la BLC avec des liquides ioniques sont encore à l'étude et le coût élevé des ILs reste un frein à leur utilisation.

I.7.4.5 Prétraitement Organosolv : généralités

La mise au point d'un procédé Organosolv étant un des objectifs fondamentaux de cette thèse, il est impératif de ce fait de mettre l'accent sur la méthodologie de prétraitement Organosolv (PO).

a. Concept

Les procédés de PO mettent en jeu un solvant organique dans le but d'éliminer la lignine afin de faciliter l'hydrolyse enzymatique de la fraction cellulosique restante. Il peut être conduit avec une variété de mélanges de solvants organiques ou aqueux-organiques, avec ou sans catalyseur tel que HCl ou H_2SO_4. Les acides organiques, notamment l'acide oxalique, l'acide acétylsalicylique et les acides salicyliques, peuvent également être utilisés comme catalyseurs de la solubilisation des hémicelluloses et de l'extraction de la lignine avec des solvants organiques ou leurs solutions aqueuses (Sun and Cheng; 2002).

b. Description du procédé et mode d'action

La plupart des prétraitements Organosolv sont conduits à des températures élevées (100 à 250 °C) à l'aide de solvants à bas point d'ébullition (méthanol et éthanol), d'alcools à point d'ébul-

lition élevé (éthylène glycol, glycérol, alcool tétrahydrofurfurylique) et d'autres classes d'agents organiques tels que des éthers, des cétones, des phénols, des acides organiques et du diméthylsulfoxyde (Thring et al.; 1990). Le prétraitement Organosolv avec alcool élimine considérablement la lignine et entraîne une solubilisation presque complète de l'hémicellulose en hydrolysant :

— les liaisons internes de la lignine, ainsi que les liaisons ester de l'éther et des acides 4-O-méthylglucuronique entre la lignine et l'hémicellulose ;

— les liaisons glycosidiques dans l'hémicellulose, et partiellement dans la cellulose en fonction des conditions du procédé (Zhao et al.; 2009).

Le PO avec les acides organiques procède par la dissociation d'un ion hydronium pour accélérer la délignification/hydrolyse de la cellulose et la dissolution des fragments de lignine (McDonough; 1992). L'ajout d'un catalyseur n'est pas nécessaire à des températures élevées (> 185 °C), car on pense que les acides organiques de la biomasse agiront comme un catalyseur pour rompre le complexe lignine-glucide (Duff and Murray; 1996). La cinétique de délignification varie en fonction du solvant utilisé lors du prétraitement. La cinétique de la délignification du bois avec de l'éthanol aqueux se produit en trois phases temporelles (initiale, principale et résiduelle), tandis que la délignification des bagasses de canne à sucre n'a lieu qu'en phase principale et résiduelle (Curvelo and Pereira; 1995), reflétant l'étendue de la distribution de la lignine dans divers substrats. Les solvants doivent être drainés et récupérés par évaporation et condensation, puis recyclés pour réduire les coûts. Ceci est également nécessaire car le solvant peut inhiber la croissance des micro-organismes, l'hydrolyse enzymatique ultérieure et la fermentation ou la digestion anaérobie. La Figure I.12 montre une conception alternative de la plate-forme de bioraffinerie basée sur le prétraitement à base de PO.

c. Avantages du prétraitement Organosolv

Le PO est une méthode de prétraitement très sélective qui donne trois fractions distinctes : la lignine sèche, un courant aqueux d'hémicellulose et une fraction de cellulose relativement très pure (Duff and Murray; 1996). La capacité d'extraction de plusieurs produits en raison de la sélectivité élevée est l'avantage le plus remarquable du PO. Le développement de procédés axés sur l'optimisation et l'utilisation intégrée des composants de la BLC est très applicable avec le PO. Ceci est recommandé pour le développement de procédé plutôt que pour l'utilisation d'hydrates de carbone uniquement (Zhao et al.; 2009). La lignine Organosolv ne contient pas de soufre, est d'une grande pureté et d'un faible poids moléculaire. Ce procédé peut être utilisé comme carburant pour alimenter les installations de prétraitement ou encore pour obtenir une lignine de haute qualité utilisée comme substitut de matériaux polymères tels que : poudres phénoliques, résines, polyuréthane, mousses polyisocyanées et résines époxy utilisées pour la fabrication de bioplastiques (Zhang; 2008). C'est la seule méthode de prétraitement physico-chimique très efficace pour le prétraitement de matériaux lignocellulosiques à haute teneur en lignine, tels que les bois tendres. Le PO peut être combiné avec une autre méthode de prétraitement pour obtenir un fractionnement de la biomasse propre et efficace ou un prétraitement en plusieurs étapes peut être mis en oeuvre sur une biomasse plus récalcitrante afin d'améliorer le

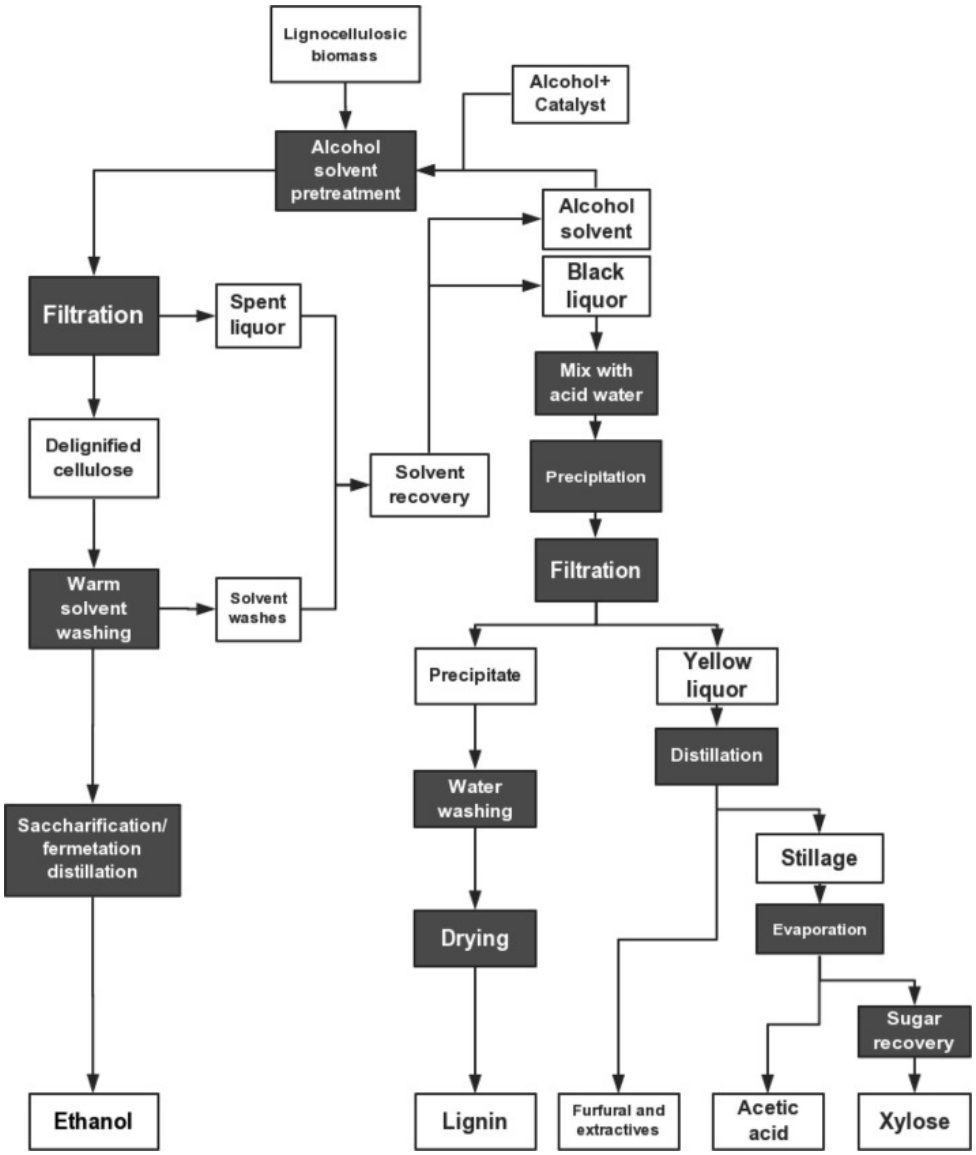


FIGURE I.12: Schéma de concept de bioraffinerie basée sur le prétraitement organosolv de la BLC (Zhang et al.; 2016)

rendement du prétraitement. La délignification par l'éthanol combinée à l'explosion à la vapeur a été réalisée en tant que processus propre pour le fractionnement du blé (Zhao et al.; 2009). Parmi les autres exemples, citons les prétraitements Bioorganosolv (Itoh et al.; 2003) et RASH (rapid-steam hydrolysis) Organosolv, qui fait référence à une combinaison de prétraitements par hydrolyse rapide en phase vapeur et d'Organosolv (Rughani and McGinnis; 1989). Les solvants organiques sont facilement récupérés par distillation et recyclés pour être réutilisés afin de réduire la consommation de produits chimiques et le coût du PO. Le PO est l'un des rares procédés de prétraitement qui ne nécessite pas de réduction importante de la taille de la matière première pour obtenir une conversion de cellulose satisfaisante, ce qui rend le processus moins énergivore, en particulier pour le prétraitement de la biomasse ligneuse (Pan, Arato, Gilkes, Gregg, Mabee, Pye, Xiao, Zhang and Saddler; 2005; Silverstein et al.; 2007; Zhua et al.; 2009).

d. Inconvénients du prétraitement Organosolv

Le coût des produits chimiques et parfois du catalyseur rend le PO plus onéreux que les autres procédés de prétraitement. Des réactions secondaires telles que la dégradation catalysée par un acide de monosaccharides en furfural et en 5-HMF, qui inhibent les micro-organismes de fermentation, ont été associées à un prétraitement à l'alcool Organosolv. L'utilisation de liquide organique volatil à haute température nécessite donc la manipulation de récipients de confinement ; aucune fuite de digesteur ne peut être tolérée en raison de risques inhérents d'incendie, d'explosion, d'environnement, de santé et de sécurité.

e. Applications

A la base, le procédé Organosolv était une alternative au procédé de mise en oeuvre de pâte à papiers Kraft (Kleinert; 1974), et ce procédé a déjà été appliqué à la fabrication de pâte Organosolv avec un degré de délignification plus élevé que le procédé Kraft initial dans l'industrie des pâtes et papiers. Le procédé énergétique Lignol pour le bioraffinage du bois en éthanol basé sur un prétraitement à l'éthanol a été bien développé et appliqué à diverses espèces de résineux depuis 2001 (Zhao et al.; 2009). La technologie basée sur le PO pourrait également être utilisée pour la production d'autres produits chimiques à valeur ajoutée et de combustibles liquides (Arato et al.; 2005). Dans les années 90, plusieurs procédés ont atteint le stade de la production industrielle : le procédé ORGANOCELL utilisant le méthanol (Lindner and Wegener; 1990, 1988, 1989), le procédé ALCELL utilisant l'éthanol (Pye; 1990), et le procédé MILOX utilisant l'acide peroxyformique (Seisto et al.; 1997), mais pour les pâtes et papiers, les procédés n'ont pas atteint la soutenabilité économique par rapport aux procédés existants (Kraft, sulfites ou soude).

I.8 Composés toxiques générés pendant le prétraitement de la BLC

Comme mentionné précédemment, des conditions sévères durant le prétraitement conduisent à la génération de certains composées toxiques qui peuvent affecter les étapes ultérieures d'hydrolyse et de fermentation.

La nature et la concentration des composés toxiques dépendent de la matière première (résineux, feuillus, plantes herbacées, etc.), du prétraitement lui-même et des conditions utilisées (température, temps de séjour, pression, pH, etc.), aussi bien que de l'utilisation de catalyseur. De plus, en raison de la nature variable des matières premières et des différentes méthodes de prétraitement, de nombreux produits de dégradation ne peuvent pas être identifiés avec précision.

Selon leur origine, les produits de dégradation peuvent être catégorisés en trois groupes : les dérivés furaniques, les acides faibles et les composés phénoliques, tous interférant de différentes manières sur les enzymes et les micro-organismes. Leur mécanisme d'inhibition n'est pas seulement basé sur l'effet inhibiteur causé par chaque composé individuellement, mais aussi sur leurs

interactions et leurs synergies.

Comme la génération de substances toxiques est étroitement liée à la technologie de prétraitement, certains prétraitements sont plus connus comme générateur d'inhibiteurs que d'autres ; ainsi, les composés inhibiteurs les plus courants libérés par la lignocellulose après différentes technologies de prétraitement sont illustrés par la Figure I.13.

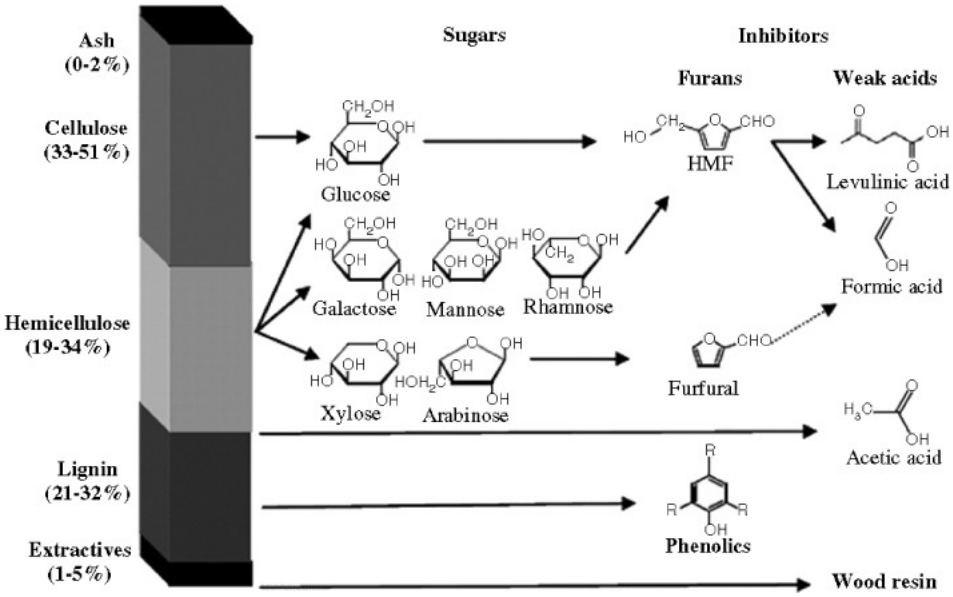


FIGURE I.13: Composition moyenne de la biomasse lignocellulosique et principaux produits d'hydrolyse (y compris les inhibiteurs de fermentation). (Almeida et al.; 2007; Klinke et al.; 2004)

I.8.1 Les furanes

Parmi les derivés furaniques, le 2-furaldehyde (furfural) et le 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) constituent les composés de dégradation majeurs générés respectivement par la dégradation des pentoses et des hexoses.

La concentration de ces composés dépend en l'occurrence des conditions employées pour le prétraitement. Ainsi, les prétraitements qui utilisent un acide en tant qu'agent hydrolytique et utilisent une température élevée et un temps de réaction important conduisent à la production de furfural et de 5-HMF à des niveaux élevés (Wyman; 2007).

La plupart des micro-organismes en fermentation sont capables de réduire les furanes en leurs alcools moins toxiques correspondants. Le 5-HMF est réduit en 2,5−bis−hydroxyméthyfurane et l'alcool furfurylique peut également être oxydé en acide formique dans des conditions anaérobies (Taherzadeh et al.; 1999). Si les furanes sont présents à concentration élevée, ils exercent un effet inhibiteur interférant avec les enzymes glycolytiques et la croissance des micro-organismes, provoquant une extension de la phase de latence et réduisant la productivité en éthanol (Almeida et al.; 2007; Klinke et al.; 2004). Ces effets dépendent de la concentration en furanes, mais sont également liés à la souche de levure.

I.8.2 Les acides carboxyliques

Les principaux acides carboxyliques générés au cours du prétraitement sont l'acide acétique, produit à partir des groupes acétyle des hémicelluloses, et l'acide formique, dérivé de la dégradation du furfural et du 5-HMF. Le 5-HMF peut également être décomposé en acide lévulinique détecté à une concentration inférieure. De plus, les acides hydroxycarboxyliques tels que l'acide glycolique et l'acide lactique sont des produits de dégradation courants résultant de la dégradation alcaline des glucides (Klinke et al.; 2004).
Les acides faibles non dissociés peuvent diffuser à travers la membrane cellulaire et se dissocier à l'intérieur de la cellule en raison du pH intracellulaire plus élevé. Ceci entraine une diminution du pH intracellulaire qui doit être compensée en pompant des protons hors de la cellule au détriment de l'ATP qui est moins disponible pour la formation de biomasse. De plus, si la capacité de pompage de l'ATPase à membrane plasmatique est franchie, l'acidification du cytoplasme et la mort cellulaire se produisent. Certaines études ont également signalé que de petites quantités d'acide acétique, formique et lévulinique pourraient augmenter les vitesses de consommation de glucose par rapport aux rendements en éthanol, car une faible concentration d'acide stimule la formation de l'ATP (Almeida et al.; 2007; Keating et al.; 2006). La concentration en acides non dissociés après prétraitement dans les hydrolysats lignocellulosiques dépend du pH. Un contrôle du pH est donc nécessaire pour réduire au minimum la toxicité des acides.

I.8.3 Les composés phénoliques

Une large gamme de composés phénoliques dérivés de la décomposition de la lignine est également générée pendant le prétraitement. Les phénols identifiés sont des monomères avec un substituant aliphatique constitué de différents groupes fonctionnels : aldéhydes, cétones ou acides. Les composés phénoliques sont présents à des concentrations plus faibles en raison de leur solubilisation mineure. La concentration et le type de composés phénoliques dépendent fortement de la matière première car la teneur en lignine et la structure chimique diffèrent selon les sources de matières lignocellulosiques. Les conditions hydrolytiques au cours du prétraitement sont également très importantes pour la fonctionnalité des produits de dégradation ; ainsi, les aldéhydes phénoliques se sont avérés être formés préférentiellement dans des conditions acides oxydantes (Klinke et al.; 2002). Après la réduction en pâte de la paille de blé, les phénols des acides p-coumarique et férulique sont produits par l'hydrolyse des hémicelluloses estérifiées et de la lignine. L'oxydation humide et alcaline de la paille de blé produit des dérivés de l'acide cinnamique. De plus, en raison du clivage oxydatif des doubles liaisons conjuguées, il se forme de l'acide 4-hydroxybenzoïque et de l'acide vanillique (Klinke et al.; 2002).
Le 4-hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, le synringaldéhyde, l'acide syringique et le catéchol sont d'autres composés phénoliques plus abondants. Ces composés sont toxiques car ils affectent l'intrigrité des membranes biologiques (Almeida et al.; 2007). De plus, il est admis qu'il existe une grande quantité de produits de dégradation dérivés de la lignine qui ne sont pas identifiés.

I.9 Méthodes d'hydrolyse décrites dans la littérature

A la suite de l'étape de prétraitement de la BLC, l'étape d'hydrolyse implique une dépolymérisation supplémentaire du composant cellulosique en glucose, qui est ensuite utilisé pour la fermentation éthanolique avec d'autres sucres libérés par l'hydrolyse d'hémicelluloses au cours de l'étape de prétraitement. En d'autres termes, cette étape déconstruit essentiellement la cellulose et l'hémicellulose en monomères ; elle est suivie d'une étape de fermentation pour convertir les monomères en bioéthanol. En raison de la présence de cinq sucres (glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose) contenus dans la biomasse lignocellulosique telle que la paille de blé, l'étape d'hydrolyse est plus compliquée que pour l'amidon qui implique un seul sucre (glucose). Par conséquent, en ce qui concerne les aspects économiques de la bioraffinerie d'éthanol cellulosique, les gestionnaires doivent prendre en compte des coûts en capital et une complexité de procédé plus élevés par rapport aux usines de bioéthanol de première génération traditionnelles à base de sucre et d'amidon. Les méthodes d'hydrolyse comprennent des procédés enzymatiques, ou des procédés chimiques à l'acide dilué ou concentré.

I.9.1 Hydrolyse chimique

Les sucres sont des intermédiaires naturels dans la conversion de la biomasse lignocellulosique, mais l'accès aux sucres est entravé par la récalcitrance des parois des cellules végétales. La dérivation des sucres à partir de cette matière première hétérogène nécessite une rupture physique ou chimique. L'hydrolyse chimique est généralement effectuée à l'aide d'acides. Les acides minéraux concentrés tels que H_2SO_4 et HCl sont couramment utilisés pour ce processus. Une autre méthode pour extraire les sucres de la biomasse consiste à utiliser des solvants cellulosiques moins dangereux et plus faciles à manipuler, tels que les liquides ioniques (ILs). Ce sont des sels liquides dont les points de fusion sont proches de ou inférieurs à la température ambiante et qui peuvent dissoudre la cellulose.

a. Hydrolyse à l'acide dilué

Le procédé d'hydrolyse à l'acide dilué est l'une des méthodes les plus anciennes, les plus simples et les plus efficaces pour produire de l'éthanol à partir de la biomasse, donc pour hydrolyser la BLC en sucres. L'hydrolyse acide dilué a été développée avec succès pour le prétraitement et améliore considérablement l'efficacité de l'étape d'hydrolyse enzymatique. On utilise généralement une concentration d'acide sulfurique inférieure à 4 %, car elle est relativement peu coûteuse et permet d'obtenir une réaction élevée. La première étape utilise de l'acide sulfurique à 0,7 % à 190 °C pour hydrolyser les hémicelluloses présentes dans la biomasse. La deuxième étape est optimisée pour hydrolyser la fraction cellulosique la plus résistante. Elle est obtenue en utilisant de l'acide sulfurique à 0,4 % à 215 °C. Les hydrolysats liquides sont ensuite neutralisés et les composés toxiques sont éliminés avant la fermentation de la solution de sucres (Brennan et al.; 1986). Bien que l'hydrolyse à l'acide dilué aboutisse à la libération de sucres fermentescibles, ils

sont toxiques, corrosifs, dangereux et nécessitent des réacteurs résistant à la corrosion, ce qui rend le procédé très coûteux. Par conséquent, des techniques plus respectueuses de l'environnement et économiquement plus réalistes sont recherchées pour hydrolyser la BLC.

b. Hydrolyse à l'acide concentré

Le procédé à l'acide concentré pour la production de sucres à partir de BLC a une longue histoire. La capacité de dissoudre et d'hydrolyser la cellulose native du coton à l'aide d'acide sulfurique concentré, suivie d'une dilution avec de l'eau, a déjà été rapportée dans la littérature dès 1883 (Harris; 1949). L'acide concentré rompt les liaisons hydrogène entre les chaînes de cellulose et la convertit en un état complètement amorphe. Une fois que la cellulose a été recristallisée, elle forme une gélatine homogène avec l'acide. La cellulose est extrêmement sensible à l'hydrolyse à ce stade. Ainsi, la dilution dans de l'eau à des températures modestes permet une hydrolyse complète et rapide en glucose, avec une dégradation minime. La plupart des recherches sur les procédés d'hydrolyse acide concentré ont été effectuées sur des épis de maïs. En 1918, des chercheurs du département de l'agriculture des États-Unis (USA) ont proposé un système de production de sucres et d'autres produits à partir d'épis de maïs, basé sur un processus en deux étapes dans lequel la biomasse est traitée avec un acide dilué pour éliminer l'hémicellulose dans la première étape, suivie par une dé-cristallisation et une hydrolyse de la fraction de cellulose en utilisant un acide concentré au deuxième stade (LaForge and Hudson; 1918). En 1937, les Allemands ont construit et exploité des installations commerciales d'hydrolyse à l'acide concentré utilisant de l'acide chlorhydrique. Plusieurs de ces installations ont été exploitées avec succès. En 1948, un procédé d'hydrolyse à l'acide sulfurique concentré a été commercialisé au Japon, où des membranes ont été utilisées pour séparer les sucres et les acides. Grâce à cette technique, ils ont pu récupérer 80 % de l'acide (Wenzl; 1970). D'autres études sur l'hydrolyse ont abouti à la mise au point d'un procédé visant à améliorer le recyclage de l'acide sulfurique (Binod et al.; 2010). Tout comme l'hydrolyse à l'acide dilué, cette technique rencontre le même problème en matière de coût dû aux caractères toxiques, corrosifs, et dangereux que représentent les acides et qui rendent nécessaires l'utilisation de réacteurs en matériaux spéciaux pour éviter leur corrosion.

I.9.2 Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est réalisée par des enzymes cellulases hautement spécifiques. Les produits de l'hydrolyse sont généralement des sucres réducteurs, notamment du glucose. Contrairement à l'hydrolyse chimique, l'hydrolyse enzymatique est réalisée dans des conditions douces, à un pH de 4,8 et à une température de 45 à 50 °C, qui sont des conditions optimales pour ces enzymes. Le principal avantage de l'hydrolyse enzymatique par rapport à l'hydrolyse chimique est qu'elle ne crée pas de problème de corrosion (Duff and Murray; 1996). Cependant, le processus a une cinétique beaucoup plus lente alors qu'il ne faut que quelques minutes dans le cas de l'hydrolyse chimique. De plus, le produit final de l'hydrolyse enzymatique inhibe l'enzyme et finit par affecter le processus, à moins que celui-ci ne soit éliminé immédiatement après sa formation.

En dehors de cela, le coût des enzymes constitue actuellement un goulot d'étranglement majeur dans la production d'éthanol issu de la BLC.

a. Hydrolyse enzymatique de la cellulose

Les cellulases se distinguent de la plupart des autres classes d'enzymes par leur capacité à hydrolyser la cellulose. Selon le système de classification CAZy (Carbohydrates-Actifs-enZyme data base), ces enzymes sont classées dans des familles de glycosyl hydrolases en fonction de leur homologie de séquence et de leur analyse par groupes hydrophobes. La cellulose est dégradée enzymatiquement en glucose par l'action synergique de trois classes distinctes d'enzymes :

i- *Les endoglucanases* (EGs) (EC 3.2.1.4), qui hydrolysent les liaisons β-1,4-glucosidiques internes de manière aléatoire dans la chaîne de la cellulose (Dashtban et al.; 2009).

ii- *Les cellobiohydrolases* (CBHs, également connues sous le nom d'exoglucanases) (EC 3.2.1.91), qui progressent le long de la cellulose et clivent les unités de cellobiose des extrémités (Lynd et al.; 2002).

iii- *Les β-glucosidases* (BGs, également connues sous le nom de β-glucosides glucohydrolases) (EC 3.2.1.21), qui hydrolysent la cellobiose en glucose et clivent également les unités de glucose des oligosaccharides cellulaires (Dashtban et al.; 2009).

Les champignons sont une bonne source de production de ces enzymes. *Trichoderma reesei* produit deux CBHs, cinq EGs et deux BGs. Il a été démontré que plusieurs de ces enzymes apparemment redondantes présentent une synergie en hydrolysant différentes extrémités de la chaîne de cellulose ou en présentant différentes affinités pour différents sites d'attaque. L'ensemble du processus d'hydrolyse peut être divisé en deux étapes : l'hydrolyse primaire et l'hydrolyse secondaire (Polaina and Maccabe; 2010). L'hydrolyse primaire implique des EGs et exoglucanases et se produit à la surface du substrat solide en libérant les sucres solubles avec un degré de polymérisation jusqu'à 6 dans la phase liquide. Cette étape de dépolymérisation est l'étape limitante pour l'ensemble du processus d'hydrolyse de la cellulose. L'hydrolyse secondaire se produit dans la phase liquide, impliquant principalement l'hydrolyse de la cellobiose en glucose par les β-glucosidases. Un schéma de principe du mécanisme d'action de ces enzymes est présenté à la Figure I.14. Les CBHs et les EGs ont un domaine catalytique (DC) et un domaine de liaison à la cellulose (DLC). Le DLC a pour fonction de mettre le module catalytique enzymatique en contact étroit avec le substrat et d'assurer une orientation correcte. L'élimination du DLC de l'enzyme entrave considérablement l'hydrolyse de la cellulose cristalline, ce qui démontre son importance. Le DLC est connecté au DC par une liaison flexible glycosylée, ce qui l'aide à s'arrimer à la cellulose cristalline et à la dégrader. Les DLC des CBHs peuvent se déplacer latéralement le long de la chaîne de la cellulose, tandis que le DC clive des unités de cellobiose. On sait très peu de choses sur la manière dont les résidus aromatiques du DLC interagissent avec la structure cristalline de la cellulose et sur la manière dont ils se désorbent du substrat et se ré-attachent. En raison de la nature insoluble de la cellulose native et de l'ancrage des DLC, les cellulases fonctionnent principalement dans un environnement bidimensionnel avec le mouvement unidi-

rectionnel des DLC le long de la chaîne de la cellulose. Par conséquent, la dégradation synergique de la lignocellulose ne suit pas la cinétique classique de Michaelis-Menten. De plus, des facteurs tels que la nature hétérogène de la lignocellulose compliquent la compréhension des mécanismes d'hydrolyse (Zhang and Lynd; 2006).

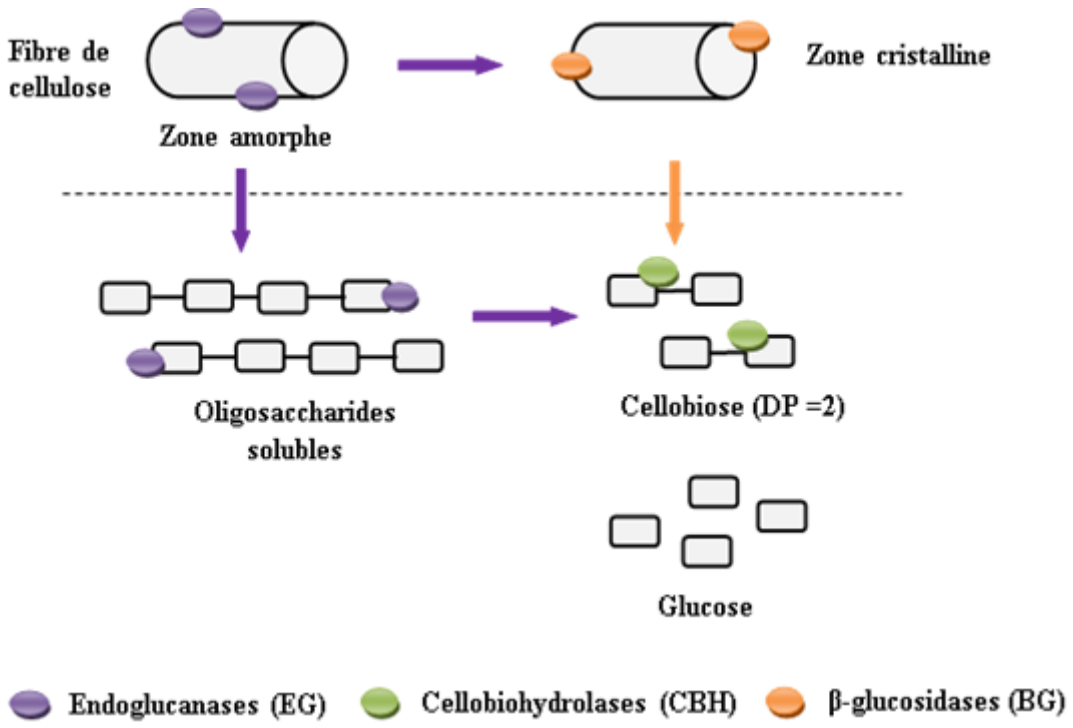


FIGURE I.14: Mécanisme d'action des cellulases

b. Hydrolyse enzymatique des hémicelluloses

Un composant majeur présent dans la biomasse lignocellulosique est le xylane, qui est le principal glucide présent dans les hémicelluloses. Le xylane est un polysaccharide à base de xylose, un sucre pentose. L'hydrolyse du xylane est réalisée par un groupe d'enzymes appelées xylanases. L'élimination du xylane des hémicelluloses à l'aide de xylanases augmente l'accessibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique. Le xylane ne forme pas de structures cristallines très compactes comme la cellulose et est plus sensible à l'hydrolyse enzymatique (Polaina and Maccabe; 2010; Polizeli et al.; 2005). Son hydrolyse complète nécessite l'action de multiples xylanases ayant des spécificités et une action qui se chevauchent mais sont différentes. Ces enzymes consistent en un domaine unique ou en plusieurs domaines, classés en domaines catalytiques et non catalytiques. *Aspergillus niger, T. reesei, Bacillus* et *Humicola insolens* sont parmi les sources industrielles et commerciales de xylanases dont la température optimale d'action varie de 40 à 60 °C. Ce système enzymatique est composé d'un répertoire d'enzymes hydrolytiques qui agissent en synergie et convertissent le xylane en sucres qui le constituent. Des enzymes supplémentaires peuvent également être nécessaires en fonction de la composition des hémicelluloses. La dégradation complète du xylane nécessite l'action coopérative des enzymes suivantes :

i- *L'endo-1,4-β-xylanase* (1,4-β-d-xylane xylanohydrolases, EC 3.2.1.8) coupe les liaisons

glycosidiques dans le squelette du xylane libérant des xylo oligosaccharides (Polizeli et al.; 2005).

ii- *La β-xylosidase* (1,4-β-d-xylan xylohydrolase, EC 3.2.1.37) agit sur les petits oligosaccharides et la cellobiose, générant des résidus β-d-xylopyranosyle à partir de l'extrémité non réductrice (Polizeli et al.; 2005).

iii- *L' α-arabinofuranosidase* (EC 3.2.1.55) et l'α-glucuronidase (EC 3.2.1.139) éliminent respectivement les substituants arabinose et acide 4-O-méthyl glucuronique du squelette du xylane (Polizeli et al.; 2005).

Enfin, les *estérases* agissent sur les liaisons ester entre les unités xylose du xylane et de l'acide acétique (acétyl xylane estérase, EC 3.1.1.72) ou entre des résidus de chaîne latérale d'arabinose et des acides phénoliques tels que l'acide férulique (*acide férulique estérase*, EC 3.2.1.73) et p-acide coumarique (estérase de l'acide p-coumarique) (Polaina and Maccabe; 2010).

I.9.3 Facteurs limitants de l'hydrolyse enzymatique

I.9.3.1 Facteurs liés aux conditions opératoires, température, pH et agitation

Les enzymes sont actives de manière optimale à un pH et une température spécifiques. De ce fait, la température a un effet primordial sur la conversion enzymatique de la BLC. Il a été démontré que la température influence également l'adsorption de la cellulase. Une relation positive entre l'adsorption et la saccharification du substrat cellulosique est observée à des températures inférieures à 60 °C . Les activités d'adsorption au-delà de 60 °C diminuent, probablement en raison de la perte de configuration enzymatique entraînant une dénaturation de l'activité enzymatique.

Faulds et al. (2008) ont étudié l'effet du pH sur la solubilisation de drèches de brasserie sur une plage de pH de 3,2 à 11,2. Un mélange enzymatique de *Trichoderma* (Depol 686, Biocatalysts) était efficace à faible pH, tandis qu'un mélange enzymatique d'*Humicola* (Depol 740, Biocatalysts) était efficace sur toute la plage de pH. Dans le mélange Depol 686, les enzymes de clivage des chaînes latérales telles que l'arabinofuranosidase perdent leur activité à des niveaux de pH plus élevés et l'activité de cellulase est absente à pH 7,5. Dans le mélange *Humicola* (Depol 740), les activités optimales se situent entre pH 6 et 8, avec une solubilisation maximale à pH 9.

Lorsqu'il s'agit de substrats de lignocellulose insolubles, la suspension et le mélange du substrat peuvent avoir un impact sur l'hydrolyse. Particulièrement dans les réacteurs à gros volume, les limitations du transfert de masse deviennent importantes (Chundawat et al.; 2008). Chundawat et al. (2008) ont indiqué qu'une agitation accrue avait un impact sur la conversion d'Avicel. Samaniuk et al. (2011) ont même mentionné que le mélange à haute intensité avait un effet synergique avec l'hydrolyse enzymatique. Cependant, d'autres auteurs ont soutenu que l'intensité de l'agitation n'avait aucun effet tant que les solides restaient en suspension. Des composés tels que le glycérol peuvent également être ajoutés pour réduire la sédimentation des particules (Chundawat et al.; 2008). Bien que Chundawat et al. (2008) ont recommandé des vitesses de mélange allant jusqu'à 400 trs/min, Champagne (2008) a indiqué qu'une vitesse

d'agitation supérieure à 200 trs/min entraînait une diminution de l'hydrolyse à mesure que l'activité enzymatique diminuait. Merino and Cherry (2007) ont également indiqué que le type de mélangeur pourrait avoir un effet significatif sur l'hydrolyse. En comparant le mélange dans un agitateur orbital par opposition au mélange classique, une hydrolyse plus efficace a été obtenue en mode classique. Ces auteurs ont souligné que cela pourrait être un facteur important sur l'hydrolyse de substrats moins sévèrement prétraités où les conversions sont souvent plus lentes. Certains auteurs ont indiqué qu'un mélange plus intense pourrait améliorer l'hydrolyse à des charges de substrat élevées (Wang et al.; 2011) tandis que d'autres le contredisent (Kristensen et al.; 2009). Bien que le mélange ait eu un effet, un mélange intense ou continu n'était pas nécessaire pour surmonter les limitations de transfert de masse pour une hydrolyse efficace, mais le mélange obtenu dans les études en fioles n'a pas été jugé représentatif (Roche et al.; 2009).

I.9.3.2 Effet du séchage du substrat

La teneur en humidité du substrat peut affecter la capacité des enzymes à l'hydrolyser (Chandra et al.; 2007) et le séchage d'un substrat peut entraîner une diminution de l'hydrolyse (Hendriks and Zeeman; 2009). Selon Hendriks and Zeeman (2009), cela est lié à un effondrement de la structure des pores, ce qui entraîne probablement une réduction de la surface totale (Esteghlalian et al.; 2001). Selon Ding et al. (2008), la déshydratation a un effet significatif sur la «structure et la disposition des microfibrilles de la paroi cellulaire». Il est indiqué qu'il existe une relation entre le séchage du substrat et la capacité d'adsorption (Boussaid and Saddler; 1999). Le protocole NREL standard pour la dégradation enzymatique de la biomasse indique qu'aucun séchage ne doit avoir lieu après les prétraitements aqueux, car il entraînerait «un effondrement irréversible des pores dans la micro-structure», ce qui défavoriserait l'hydrolyse (Selig; 2008). Le séchage peut induire une perte irréversible de la capacité de liaison à l'eau, ce qui entraîne une perte de porosité (Luo and Zhu; 2011). Les pores seraient plus importants pour l'accessibilité des enzymes que la surface externe (Luo and Zhu; 2011). Zhang and Lynd (2004) ont indiqué que la taille des pores devrait être suffisamment grande pour accueillir une enzyme typique d'un diamètre de 51 Å. Bien que la ré-hydratation puisse augmenter la surface, les pores ne sont pas restaurés. Zhang and Lynd (2004) ont indiqué que la surface de l'Avicel pouvait passer de 5,4 m^2/g à 18 m^2/g lorsqu'ils étaient exposés à un gonflement de l'eau pendant une longue période.

I.9.3.3 Charge d'enzymes et de substrats

Les enzymes représentent un coût important dans la bioconversion et, par conséquent, la détermination de la quantité totale de protéines à utiliser dans la saccharification est primordiale (Kumar and Wyman; 2009). L'efficacité du processus peut être mesurée comme la quantité de sucres (en g) produite par mg de protéines. En plus des charges enzymatiques, la charge de substrat doit être suffisamment élevée pour atteindre des niveaux de sucre suffisants pour la fermentation. Ainsi, les charges optimales d'enzyme et de substrat doivent être identifiées pour

une efficacité et une économie optimales (g de protéines/g de substrat).

Les charges enzymatiques peuvent différer en fonction du substrat et de sa composition, ainsi que du type de prétraitement spécifique. Les substrats ayant une composition en lignine élevée peuvent nécessiter des charges enzymatiques plus élevées en raison de l'adsorption non productive d'enzymes sur la portion de lignine. Par exemple, Boussaid and Saddler (1999) ont mesuré la quantité d'enzyme minimale requise pour dégrader complètement un substrat. Avec l'Avicel, ils ont pu atteindre des charges enzymatiques de 40 mg/g de cellulose (ou 40 FPU/g de cellulose), tandis que 60 FPU/g étaient nécessaires pour la pâte Kraft délignifiée. Cependant, même des charges enzymatiques de 750 FPU/g de cellulose n'étaient pas en mesure d'hydrolyser complètement la pulpe qui contenait 28% de lignine. La charge enzymatique peut également dépendre du fait que la combinaison enzymatique est optimale pour le substrat, par exemple, les charges de cellulase seront plus faibles en présence de xylanase. Des charges enzymatiques plus élevées sont généralement également requises pour les mélanges commerciaux car l'activité spécifique des enzymes sera plus faible.

I.9.3.4 Effet de la concentration en eau

Travailler avec un système à faible teneur en eau peut affecter directement les performances enzymatiques. Non seulement l'eau est un substrat pour la réaction d'hydrolyse mais c'est aussi le solvant qui permet le fonctionnement des enzymes, le contact entre les enzymes et le substrat et le transport des produits (Daniel et al.; 2004). Le rôle de l'eau dans l'hydrolyse enzymatique a été étudié en détail (Felby et al.; 2008). Dans cette étude, les auteurs ont voulu déterminer si l'effet des solides était lié à une concentration en eau plus faible par rapport aux solides. Comme mentionné, l'hydrolyse est possible à des concentrations de solides très élevées mais la vitesse de réaction peut être altérée dans de telles conditions (Mandels and Reese; 1965). De ce fait une quantité d'eau assez importante est nécessaire pour une meilleure hydrolyse enzymatique et pour un meilleur mélange.

I.9.3.5 Effet des inhibiteurs

Au cours du prétraitement, divers inhibiteurs peuvent se former, tels que les composés phénoliques, le furfural, le 5-hydroxyméthyl furfural, l'acide p-coumarique, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acétovanillone, le gaïacol et l'acide protocolatéchuique, les acides hydroxy-cinnamique et 4-hydroxybenzoïque (Hendriks and Zeeman; 2009; Palmqvist and Hahn-Hägerdal; 2000). Différents prétraitements génèrent différents composés inhibiteurs et la revue de Hendriks and Zeeman (2009) résume les types d'inhibiteurs formés par des prétraitements spécifiques et leur impact sur les procédés ultérieurs de bioconversion et de fermentation. La revue de Palmqvist and Hahn-Hägerdal (2000) a spécifiquement étudié l'impact des inhibiteurs sur la fermentation. Diverses études ont été menées sur l'effet des composés de dégradation phénolique et de la lignine sur les enzymes saccharolytiques. Ximenes et al. (2011) ont étudié l'effet des acides tannique, gallique, hydroxy-cinnamique et 4-hydroxybenzoïque, ainsi que de la vanilline sur les cellulases

et les β-glucosidases et ont trouvé une désactivation de 20 à 80 %. L'inhibition varie en fonction des enzymes spécifiques, de la source dont elles dérivent et du composé particulier (Ximenes et al.; 2011). Bien que les inhibiteurs phénoliques résultant des prétraitements puissent être éliminés avec succès par lavage du substrat, jusqu'à 15 % des sucres dans la biomasse peuvent être perdus de cette manière (Chundawat et al.; 2008).
La présence de lignine dans le substrat peut également avoir un impact inhibiteur sur les enzymes impliquées dans l'hydrolyse. Berlin et al. (2006) ont constaté que les cellulases, les xylanases et la β-glucosidase présentaient une inhibition par la présence de lignine, la β-glucosidase étant la moins affectée. Senior et al. (1991) ont également confirmé l'inhibition des xylanases par la lignine. Sewalt et al. (1997) ont constaté que les cellulases étaient inhibées jusqu'à 60 % par des concentrations accrues de lignine. Kaya et al. (2000) ont constaté que la lignine soluble pouvait activer les xylanases à de faibles concentrations, mais que les produits de dégradation de la lignine provoquaient une inhibition à des concentrations plus élevées. Morrison et al. (2011) ont constaté que la lignine n'avait pas d'effet significatif sur une xylanase (XynA) de *C. cellulovorans*.

Il est reconnu que les enzymes sont inhibées par les produits issus de leur action. Les cellulases sont inhibées par le cellobiose (Gruno et al.; 2004), tandis que la β-glucosidase est inhibée par le glucose (Andrić et al.; 2010). Pour cette raison, un excès de β-glucosidase est généralement ajouté aux cellulases dans les processus de bioconversion pour empêcher l'inhibition des cellulases. Certains chercheurs ont approfondi l'impact des oligosaccharides et des sucres autres que le cellobiose et le glucose sur les cellulases et ont constaté que les sucres dérivés de l'hémicellulose (xylose, arabinose, mannose, galactose) inhibaient la conversion de la cellulose (García-Aparicio et al.; 2006; Xiao et al.; 2004). Certains rapports ont même indiqué que les xylo-oligomères étaient des inhibiteurs de cellulases plus puissants que le glucose et le cellobiose (Kumar et al.; 2009; Qing and Wyman; 2011; Qing et al.; 2010).

I.10 Fermentation éthanolique

I.10.1 Généralités

Comme indiqué ci-dessus, la biomasse lignocellulosique est constituée d'hexoses (glucose, mannose et galactose) et de pentoses (sucres de carbone C5 xylose et arabinose). Ainsi, le procédé de fermentation représente la conversion des sucres fermentescibles (hexoses) en éthanol et coproduits du métabolisme cellulaire :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

Une analyse de rentabilité améliorée pour la bioconversion lignocellulosique industrielle nécessite des micro-organismes qui peuvent fermenter de manière optimale les sucres hexoses et pentoses en même temps sans formation de produits inhibiteurs toxiques (Harner et al.; 2015). Les problèmes de récupération des micro-organismes sont des contraintes majeures à l'économie de la bioraffinerie cellulosique (Gawand et al.; 2013). La plupart des fermentations industrielles uti-

lisent la levure *Saccharomyces cerevisiae* en raison de plusieurs avantages (Hahn-Hägerdal et al.; 2007) :

i) la capacité à obtenir des rendements élevés de fermentation de l'éthanol, couplée à une forte acceptation par le marché et le public ;

ii) la résistance à une pression osmotique élevée, ainsi que la tolérance à des pH faibles et aux produits inhibiteurs.

La levure de *S. cerevisiae* peut métaboliser les sucres hexose (glucose) en éthanol tant dans des conditions anaérobies qu'aérobies et à température contrôlée étant donné son incapacité à utiliser efficacement le xylose comme source unique de carbone (Lynd et al.; 2002; Ohgren et al.; 2007).

Le rendement théorique est de 0, 511 g d'éthanol/g d'hexose. Cependant, en raison de la formation de sous-produits tels que le glycérol et les acides organiques et de la croissance et maintenance cellulaire, le rendement réel maximal est d'environ 0,485 g d'éthanol/g d'hexose, appelé rendement de Pasteur (Soccol et al.; 2019). Au cours du processus de fermentation, plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la température, l'oxygène dissous, le pH et les nutriments doivent être contrôlés pour le développement approprié du micro-organisme. Une fois ces paramètres ajustés, la fermentation démarre et se déroule généralement en batch, afin d'éviter la formation excessive de gaz et de mousse. Les cuves de fermentation sont généralement fermées et disposent d'un système de contrôle de température interne ou externe. Après la fermentation, les cellules pourraient être récupérées par centrifugation, traitées avec de l'acide sulfurique et des nutriments afin d'améliorer la viabilité et utilisées comme inoculum pour la fermentation ultérieure.

I.10.2 Facteurs d'influence de la fermentation

Plusieurs facteurs influencent la production de bioéthanol, notamment la température, la concentration en sucre, le pH, le temps de fermentation, la vitesse d'agitation et le volume de l'inoculum (Mohd Azhar et al.; 2017; Zabed et al.; 2014).

I.10.2.1 Effet de la température

Le taux de croissance des micro-organismes est directement affecté par la température (Charoenchai et al.; 1998). Une température élevée, défavorable à la croissance cellulaire, devient un facteur de stress pour les micro-organismes (Cot et al.; 2007). La plage de température idéale pour la fermentation se situe entre 20 et 35 °C. Les cellules libres de *S. cerevisiae* ont une température optimale proche de 30 °C tandis que les cellules immobilisées ont une température optimale légèrement supérieure en raison de leur capacité à transférer la chaleur de la surface des particules à l'intérieur des cellules (Liu and Shen; 2008). De plus, les enzymes qui régulent l'activité microbienne et le processus de fermentation sont sensibles aux hautes températures qui peuvent dénaturer leur structure tertiaire et inactiver les enzymes (Phisalaphong et al.; 2006). Ainsi, la température est soigneusement régulée tout au long du processus de fermentation.

I.10.2.2 Effet de la concentration en sucres

L'augmentation de la concentration en sucres jusqu'à un certain niveau permet d'augmenter le taux de conversion en éthanol. Cependant, l'utilisation d'une concentration excessive de sucre entraînera un taux de fermentation stable, qui est atteint lorsque la concentration en sucre utilisée dépasse la capacité d'absorption des cellules microbiennes. Généralement, le rendement maximal de production d'éthanol est atteint lors de l'utilisation de sucres à la concentration de 150 g/L. La concentration initiale en sucre est également considérée comme un facteur important dans la production d'éthanol. Une productivité et un rendement élevés en éthanol en fermentation discontinue peuvent être obtenus en utilisant une concentration initiale en sucre plus élevée. Cependant, ce mode de culture nécessite un temps de fermentation plus long et induit un coût de récupération de l'éthanol plus élevé (Mohd Azhar et al.; 2017; Zabed et al.; 2014).

I.10.2.3 Effet du pH

La production d'éthanol est influencée par le pH du milieu de culture car elle affecte la contamination bactérienne, la croissance des levures, le taux de fermentation et la formation de sous-produits. La perméabilité de certains nutriments essentiels aux cellules est influencée par la concentration en H^+ dans le moût de fermentation (Mohd Azhar et al.; 2017; Zabed et al.; 2014). De plus, la survie et la croissance des levures sont influencées par le pH de 2,75 à 4,25 (Fleet and Heard; 1993). En fermentation pour la production d'éthanol, la plage de pH optimale de *S. cerevisiae* est de 4,0 à 5,0 (Lin et al.; 2012). Lorsque le pH est inférieur à 4,0, une période d'incubation plus longue est nécessaire, mais la concentration d'éthanol réduite de manière significative. Cependant, lorsque le pH est supérieur à 5,0, la concentration d'éthanol diminue considérablement (Staniszewski et al.; 2007).

I.10.2.4 Effet de la durée de fermentation

La durée de fermentation affecte la croissance des micro-organismes. Un durée plus courte induit une fermentation peu efficace en raison d'une croissance plus faible des micro-organismes. D'un autre côté, un temps de fermentation trop long produit un effet toxique sur la croissance microbienne, en particulier en mode discontinu en raison de la forte concentration d'éthanol dans le moût de fermentation. Une fermentation complète peut être obtenue à une température plus basse en utilisant une durée de fermentation plus longue qui se traduit par un rendement en éthanol plus faible (Mohd Azhar et al.; 2017; Zabed et al.; 2014).

I.10.2.5 Effet de l'agitation

La vitesse d'agitation contrôle le transfert des nutriments du moût de fermentation vers l'intérieur des cellules, ainsi que l'excrétion de l'éthanol de la cellule vers le moût de fermentation. Plus l'agitation est intense, plus la quantité d'éthanol produit est élevée. En outre, elle augmente

la consommation de sucre et réduit l'inhibition de l'éthanol sur les cellules. En laboratoire, une gamme de vitesse d'agitation communément employée pour la fermentation par des levures est de 150 à 200 trs/min.

I.10.2.6 Effet de la concentration de l'inoculum

La concentration en inoculum ne donne pas d'effets significatifs sur la concentration finale en éthanol, mais elle affecte le taux de consommation de sucre et la productivité de l'éthanol (Laopaiboon et al.; 2007). La production d'éthanol augmente avec l'augmentation du nombre de cellules de 10^4 à 10^7 cellules par mL, mais aucune production significative d'éthanol n'a été trouvée entre 10^7 et 10^8 cellules par mL. En effet, l'augmentation de la concentration cellulaire dans une certaine plage réduit la durée de fermentation car les cellules se développent rapidement et transforment directement les sucres en éthanol (Mohd Azhar et al.; 2017; Zabed et al.; 2014).

Table I.5: Facteurs affectant la production de bioéthanol

Souche de levure	*S. cerevisiae* CHY1011	*S. cerevisiae* ZU-10	*S. cerevisiae*	*S. cerevisiae* ATCC #24858	*S. cerevisiae* GIM-2
Matière première	Amidon de cassave	Paille (maïs)	Bois	Roseau	Effluent papetier
Température (°C)	32	30	30	30	33
pH	4,5	5,5	5,5	5,0	-
Durée (h)	66	72	16	96	16
Concentration en sucre (g/L)	195	99,0	37,47	123,0	27,8
Vitesse d'agitation (trs/min)	120	120	250	150	60
Volume de l'inoculum (%)	5	5	5	10	6
Concentration en éthanol (g/L)	89,1	41,2	18,52	55,0	9,5
Productivité d'éthanol (g/L/h)	2,1	0,57	1,16	0,57	0,59
Références	Choi et al. (2010)	Zhao and Liu (2010)	Gupta et al. (2009)	Li et al. (2009)	Peng and Chen (2011)

I.11 Concept de bioraffinerie

Le concept de bioraffinerie englobe un large éventail de technologies capables de séparer les ressources de biomasse (bois, herbes, maïs, etc.) en leurs blocs de construction (glucides, protéines, graisses, etc.) qui peuvent être convertis en produits à forte valeur ajoutée, biocarburant, et produits chimiques. Une bioraffinerie est une installation (ou un réseau d'installations) qui intègre des processus et des équipements de conversion de la biomasse pour produire des

biocarburants, de l'électricité et des produits chimiques à partir de la biomasse (Cherubini and Strømman; 2011). La Figure I.15 donne un aperçu des voies de conversion possibles pour obtenir les produits énergétiques et les matériaux souhaités à partir de différentes matières premières biosourcées, grâce à des procédés technologiques appliqués conjointement (Cherubini; 2009). Le concept de bioraffinerie est analogue dans son principe à la raffinerie de pétrole actuelle qui permet d'obtenir simultanément plusieurs types de combustibles et de produits chimiques à partir du pétrole. La biomasse est constituée d'une énorme variété d'espèces végétales dont la morphologie et la composition chimique varient. Des raffineries de pétrole sont déjà construites et l'utilisation des infrastructures existantes pour la production de biocarburants nécessitent peu d'investissement en capital (Marker; 2005). De plus, l'infrastructure de mélange des carburants ainsi que leur test et leur distribution sont déjà en place dans les raffineries de pétrole. Trois options sont disponibles pour utiliser les raffineries de pétrole afin de convertir les matières premières dérivées de la biomasse en carburants et produits chimiques :

(i) craquage catalytique fluide,

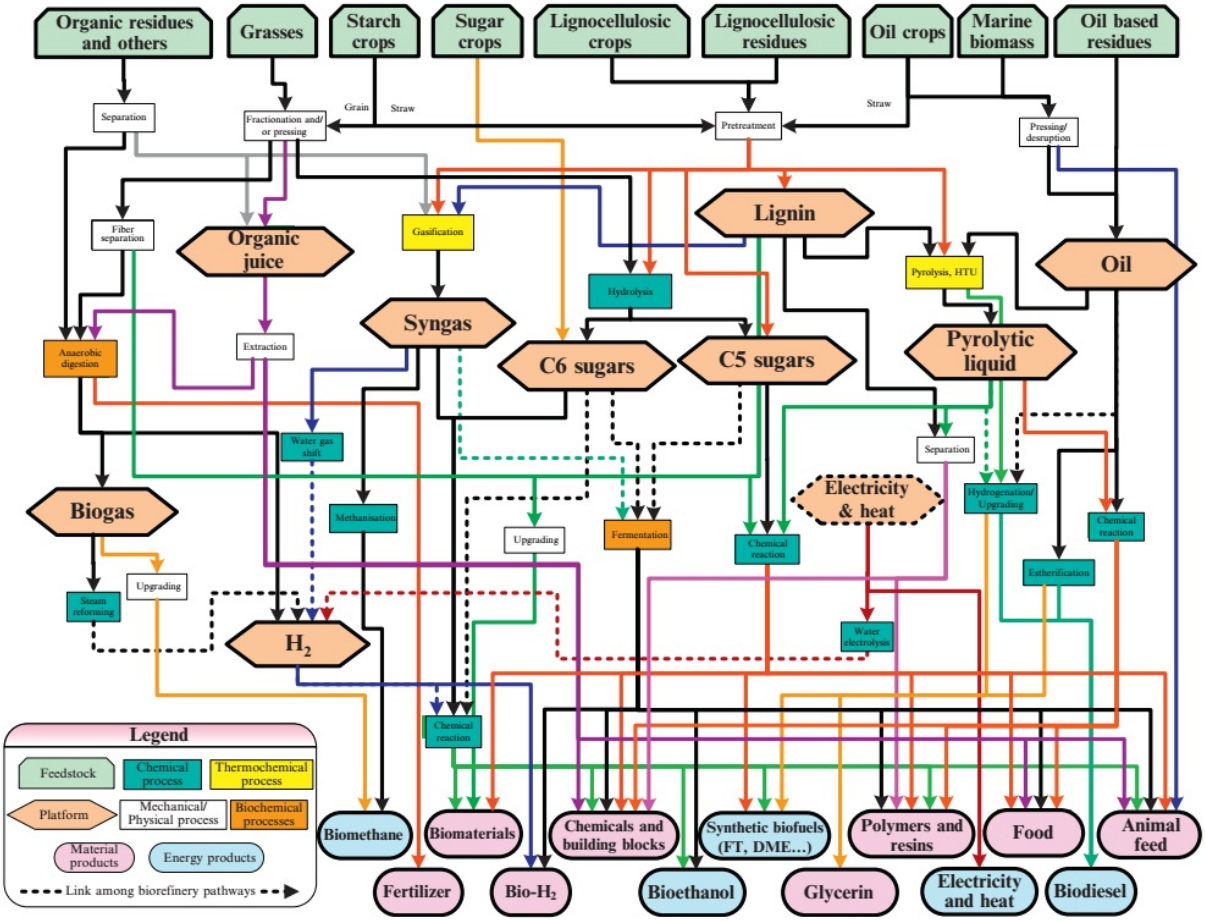
(ii) hydrotraitement-hydrocraquage,

(iii) utilisation de gaz de synthèse dérivé de la biomasse (syngas) ou l'hydrogène.

La co-alimentation de molécules dérivées de la biomasse dans une raffinerie de pétrole pourrait rapidement réduire notre dépendance vis-à-vis des matières premières pétrolières. Les matières premières dérivées du pétrole sont chimiquement différentes des matières premières dérivées de la biomasse ; par conséquent, un nouveau paradigme dans la façon d'exploiter et de gérer une raffinerie de pétrole est nécessaire. Une autre amélioration vers la production de biocarburants dans une raffinerie de pétrole serait que les gouvernements offrent des exonérations fiscales et des subventions à tous les types de biocarburants, et pas seulement pour certains biocarburants tels que l'éthanol et le biodiesel. Alors que le prix du pétrole continuera d'augmenter à long terme à cause de l'épuisement des ressources, nous prévoyons que les technologies de bioraffinage seront amenées à se développer pour permettre la coproduction de biocarburants à partir de BLC et de combustibles à base de pétrole dans une même raffinerie en utilisant les mêmes réacteurs et équipements. Un scénario pratique et réaliste consistera en une coopération des deux industries, l'une produisant les précurseurs de biocarburants et l'autre les transformant en combustibles (Huber and Corma; 2007).

I.12 Stratégie de choix de solvant du procédé Organosolv

Selon la littérature, le prétraitement par Organosolv est l'un des procédés de prétraitement les plus appropriés pour les bioraffineries de matériaux lignocellulosiques car tous les composés majeurs de la biomasse sont facilement valorisables, puisque convertibles en carburants et produits chimiques à moyenne ou haute valeur valeur (Zhou et al.; 2018; Brosse et al.; 2019; Zhao et al.; 2009). Plusieurs solvants dont le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'éthylène glycol, le triéthylène glycol, l'alcool tétrahydrofurfurylique ont été utilisés comme solvant organique dans



Source : Cherubini and Strømman (2011)

FIGURE I.15: Schéma de concept d'une bioraffinerie lignocellulosique

ce procédé (Amarasekara; 2014; Borand and Karaosmanoğlu; 2018), mais les alcools à bas point d'ébullition, comme le méthanol et l'éthanol, ont souvent été considérés comme les plus appropriés pour les procédés Organosolv, en raison de leur faible coût et de leur recyclage simple à mettre en œuvre (Brosse et al.; 2019; Zhao et al.; 2009).

Toxicité et coût

Pour un solvant à bas point d'ébullition, sa volatilité est le critère clé qui permet de le récupérer et recycler facilement par distillation, opération unitaire parfaitement maîtrisée, après le prétraitement. Dans le cas des mélanges avec l'eau, il est donc possible de travailler avec des concentrations en solvant plus faibles. Ainsi, l'éthanol peut être récupéré assez classiquement par distillation, mais son prix un peu plus élevé que celui du méthanol engendre un coût légèrement supérieur à celui du prétraitement au méthanol, d'autant plus que son point de fusion est plus proche de celui de l'eau et que les mélanges eau/éthanol forment des azéotropes (Chum et al.; 1985). Toutefois, par rapport au méthanol, l'éthanol est moins toxique et le prétraitement peut être effectué avec une concentration en solvant organique plus faible. En conséquence, l'éthanol est plus sûr de loin, préféré au méthanol du fait de la toxicité importante de ce dernier (Borand and Karaosmanoğlu; 2018; Zhao et al.; 2009).

Effet de l'éthanol sur l'hydrolyse enzymatique

Les premiers travaux de recherches sur le prétraitement à l'éthanol pour l'hydrolyse enzymatique remontent à 1983, lorsque Neilson et al. (1983) ont constaté que la délignification à l'éthanol était un prétraitement efficace en amont de l'hydrolyse enzymatique (Table I.6). Le rendement en sucre de la pâte EtOH/H_2O du peuplier par hydrolyse enzymatique avec la cellulase de *Trichoderma reesei* était de 1,8 à 2,5 fois supérieur à celui du substrat non traité. Un rendement en sucre similaire a également été obtenu lorsque le peuplier a été prétraité avec des mélanges de catalyseurs EtOH/H_2O et digéré par des cellulases (Holtzapple and Humphrey; 1984). Depuis 2001, le procédé *Lignol*, une technologie de bioraffinage du bois en éthanol basée sur un prétraitement à l'éthanol, a été bien développé et appliqué à diverses espèces de bois de conifères de l'ouest du Canada. Cette technologie est une combinaison intégrée de deux éléments majeurs du procédé générique. Le premier est une étape Organosolv améliorée à base d'éthanol qui comprend la récupération de multiples sous-produits, tandis que le second est une étape de saccharification enzymatique et de fermentation qui convertit la cellulose en éthanol. Une bioraffinerie basée sur la technologie *Lignol* pourrait convertir un ensemble de matières premières cellulosiques en une série de produits chimiques organiques et de combustibles liquides à haute valeur ajoutée (Arato et al.; 2005). La sensibilité à l'hydrolyse de la biomasse prétraitée par le procédé *Lignol* a été considérablement accrue. Par exemple, plus de 90 % de la cellulose des pâtes à faible teneur en lignine (<18,4 % de lignine résiduelle) a été hydrolysée en glucose en 48 heures en utilisant une charge enzymatique de 20 unités de papier filtre (FPU)/g de cellulose. De même, la cellulose dans une pâte à forte teneur en lignine (27,4 % de lignine résiduelle) a été hydrolysée à plus de 90 % de conversion en 48 h en utilisant 40 FPU/g de cellulose. Les pâtes ont donné de bons résultats lors des essais de saccharification et de fermentation en séquentiel et en simultané, ce qui indique une absence d'inhibiteurs métaboliques (Pan, Arato, Gilkes, Gregg, Mabee, Pye, Xiao, Zhang and Saddler; 2005). Le prétraitement Organosolv à l'éthanol de peupliers hybrides et de pins tordus parasités par le dendroctone s'est également révélé très efficace pour augmenter la digestibilité enzymatique (Pan et al.; 2006, 2007). Les rendements de conversion enzymatique de la cellulose étaient respectivement de $\sim$ 85 % et $\sim$ 97 % pour le peuplier hybride et le pin tordu parasité par le dendroctone.

Lignine à haute qualité

Le procédé Organosolv est connu pour sa capacité à produire de la lignine essentiellement faiblement dégradée et moins condensée que celle d'autres procédés (procédé Kraft, explosion à la vapeur, etc.). Le traitement par explosion à la vapeur provoque par exemple la dégradation et la transformation de la lignine en raison de la température élevée et des conditions de stress mécanique. La plus grande partie de la lignine reste encore dans le solide, ce qui entraîne une absorption inéluctable et irréversible de la cellulase (Pan, Xie, Gilkes, Gregg and Saddler; 2005; Berlin et al.; 2005). Une extraction de la lignine à l'éthanol permet donc d'éliminer cette absorption non-productive en favorisant l'élimination, parfois de plus de 50 % de la lignine, par le

clivage des liaisons inter-unitaires β-O-4 et des liaisons lignine-glucides, ce qui induit sa solubilisation ultérieure dans l'éthanol. Le processus d'extraction de l'éthanol est donc un phénomène composite de dégradation, de solvatation et de solubilisation. La lignine peut ensuite être précipitée et récupérée dans la liqueur de prétraitement concentrée (Zhou et al.; 2018).
En général, la lignine isolée du procédé Organosolv à l'éthanol est de grande pureté, de faible poids moléculaire et sans soufre ; elle présente aussi une excellente solubilité dans les solvants organiques courants et une température de transition vitreuse assez basse (Wen et al.; 2013). Ce type de lignine pourrait être utilisé dans de nombreuses applications industrielles, par exemple pour une utilisation directe ou comme précurseur pour des applications de carburant et de matériaux telles que les adhésifs, les films et les polymères biodégradables ; mais elle pourrait également être employée comme matière première pour des produits chimiques à haute valeur ajoutée (Tribot et al.; 2019).

En résumé

La littérature démontre que l'éthanol est un des solvants préférés pour le prétraitement Organosolv parce que son utilisation dans ce prétraitement offre de nombreux avantages tels que son coût relativement bas, sa faible toxicité, sa grande volatilité, son respect de l'environnement, sa miscibilité totale avec l'eau, sa grande efficacité pour la délignification, ainsi que sa facilité de récupération, de recyclage et de réutilisation. De plus, comme l'éthanol lui-même est le produit final du processus de production de bioéthanol, l'élimination du solvant de l'éthanol après l'étape du prétraitement ne pose pas de problème, contrairement aux situations où le méthanol ou un autre solvant organique est utilisé en tant qu'agent de prétraitement.

Table I.6: Prétraitement de l'éthanol avec et sans catalyseur pour la production de biocarburant à partir de biomasse cellulosique.

Matière première	Solvant alcoolique (Catalyseur)	Conditions de prétraitement	Résultats	Référence
Miscanthus	50 % Éthanol (Absence)	12% de teneur en solides à 190 °C pendant 80 min	75% d'élimination de la lignine	Brosse et al. (2009)
Eucalyptus	50 % Éthanol (Absence)	10 % de contenu solide à 200°C pendant 60 min	Lignine réduite de 32 % à 11 %	Wen et al. (2013)
Peuplier	50 % Éthanol (0,2 mol/L Acide acétique)	10 % de teneur en matières solides à 170 °C pendant 240 min	4 % de lignine restante, hydrolysée enzymatiquement 2,5 fois le rendement en sucre que l'échantillon non traité	Neilson et al. (1983)
Eucalyptus	75% Éthanol (acide acétique à 1 %)	20 % de teneur en solides à 200 °C pendant 60 minutes	67 % d'hémicellulose solutée et 12 % de lignine	Teramoto et al. (2008)
Résineux mélangés	40-60 % Éthanol (H_2SO_4 ajustant le pH 2,0-3,4)	10-15 % de teneur en solides à 185-198 °C pendant 30-60 min	Minimum 6,4 % de lignine résiduelle, conversion > 90% de solides en glucose avec l'enzyme 20 FPU	Pan, Arato, Gilkes, Gregg, Mabee, Pye, Xiao, Zhang and Saddler (2005)
Peuplier hybride	25-75 % Éthanol (0,83-1,67% H_2SO_4)	10% de teneur en solides à 155-205 °C pendant 26-94 min	Condition optimale a donné 88% de cellulose avec une efficacité d'hydrolyse de 82 % et 72 % de xylose	Pan and Sano (2005)
Pin tordu	48-82 % Éthanol (0,76-1,44 % H_2SO_4)	10 % de teneur en solides à 153-187 °C pendant 43-77 min Condition optimale	La récupération combinée a donné 83 % de cellulose avec une efficacité d'hydrolyse de 97 %	Pan et al. (2007)
Miscanthus	44 % Éthanol (0,5 % H_2SO_4)	12 % de teneur en solides à 170 °C pendant 60 min	81,5% de cellulose et 62 % de lignine Klason	Brosse et al. (2009)
Pin radiata	60 % Éthanol (0,13 % H_2SO_4)	16 % de teneur en solides à 185 °C pendant 18 min	Fermentation ayant donné 63,8 % par le champignon	Monrroy et al. (2010)
Épicéa de Sitka	50-70 % Éthanol (0,75-1,25 % H_2SO_4)	10 % de teneur en solides à 150-180 °C pendant 25-85 min (Conditions optimales de conversion)	86 % d'hémicelluloses en éthylglycosides	Bouxin et al. (2014)

I.13 Objectifs spécifiques de ce travail de doctorat

Les organismes financeurs de cette thèse de doctorat, FEDER et la région Auvergne-Rhône-Alpes (AURA), ont pour ambition de développer des briques technologiques efficientes et respectueuses de l'environnement pour une mobilité innovante des personnes, des biens et des machines. Pour ce faire, l'un des défis de la région AURA est de développer des procédés de production d'énergie pour la mobilité en s'inscrivant dans le contexte du défi énergétique actuel. Ainsi, depuis 2017, nous travaillons sur la thématique de la production d'éthanol Organosolv au sein de l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand et plus particulièrement dans l'axe Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes (GePEB) de ce laboratoire. L'objectif du présent projet de thèse est donc d'optimiser un procédé Organosolv (procédé aux solvants organiques) consacré à la biomasse du bois sur la base de critères scientifiques, technologiques, économiques et environnementaux, afin de l'adapter à la variété de ressource forestière de la région. Cette ressource présente la particularité d'associer différentes essences de bois, ce qui constitue un enjeu technologique supplémentaire. Par conséquent, ce travail de doctorat sera résumé comme suit :

i- Premièrement, notre choix s'est porté sur une ressource de biomasse lignocellulosique locale composés de résidus d'exploitation forestière constitués d'un mélange de résineux, ce qui diffère des études habituelles qui se concentrent généralement sur une essence unique, mais qui traduit bien la diversité de la ressource régionale ;

ii- Deuxièmement, à partir de notre analyse du procédé Organosolv, le solvant sélectionné correspond à un mélange eau/éthanol ; ainsi, une étude expérimentale du fractionnement de la biomasse sera conduite en fonction des conditions opératoires (composition du solvant, rapport massique solide/solvant, température, pression. . .) sur la matière première disponible afin d'optimiser son fractionnement.

iii- Troisièmement, la fraction cellulose/hémicellulose récupérée lors du prétraitement sera soumise à des étapes d'hydrolyse/fermentation, tandis que la lignine obtenue comme coproduit sera utilisée dans un autre projet de thèse pour une valorisation ultérieure (valorisation matière).

iv- Enfin, un scénario adapté aux charges d'alimentation régionales sera utilisé dans une simulation de procédé décrivant l'ensemble des étapes du bioraffinage de la ressource lignocellulosique locale.

Au terme de ce projet de thèse de trois ans, l'objectif est de proposer un procédé détaillé et une conception préliminaire d'une unité de démonstration représentative de la future bioraffinerie forestière régionale conduisant à une utilisation optimisée des matières premières biosourcées et à une valorisation optimisée des coproduits.

Bibliographie

Airoldi, L., Abbiati, M., Beck, M. W., Hawkins, S. J., Jonsson, P. R., Martin, D., Moschella, P. S., Sundelöf, A., Thompson, R. C. and Åberg, P. (2005). An ecological perspective on

the deployment and design of low-crested and other hard coastal defence structures, *Coastal Engineering* **52**(10) : 1073–1087.

Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T. I. and Dale, B. E. (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX), *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124**(1) : 1133–1141.

Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G. and Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **82**(4) : 340–349.

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, *Bioresource Technology* **101**(13) : 4851–4861.

Amarasekara, A. S. (2014). *Handbook of cellulosic ethanol.*

Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A. and Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis : I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes, *Biotechnology Advances* **28**(3) : 308–324.

Arato, C., Pye, E. K. and Gjennestad, G. (2005). The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124** : 871–882.

Aubert, M.-H., Champanhet, F., Bénézit, J.-J. and Talon, M.-R. (2017). Durabilité de l'huile de palme et des autres huiles végétales. https://agriculture.gouv.fr/durabilite-de-lhuile-de-palme-et-des-autres-huiles-vegetales, consulté le 22/06/2020".

Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S. and Saddler, J. (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and β-glucosidase activities by softwood lignin preparations, *Journal of Biotechnology* **125**(2) : 198–209.

Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M., Kilburn, D. and Saddler, J. (2005). Weak Lignin-Binding Enzymes, *in* B. H. Davison, B. R. Evans, M. Finkelstein and J. D. McMillan (eds), *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 163–170.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K. and Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw : An overview, *Bioresource Technology* **101**(13) : 4767–4774.

Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants, *Progress in Polymer Science* **19**(5) : 797–841.

Borand, M. N. and Karaosmanoğlu, F. (2018). Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications : A review, *Journal of Renewable and Sustainable Energy* **10**(3) : 033104.

Borja, A. (2014). Grand challenges in marine ecosystems ecology, *Frontiers in Marine Science* **1**.

Boussaid, A. and Saddler, J. N. (1999). Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps, *Enzyme and Microbial Technology* **24**(3) : 138–143.

Bouxin, F. P., David Jackson, S. and Jarvis, M. C. (2014). Organosolv pretreatment of Sitka spruce wood : Conversion of hemicelluloses to ethyl glycosides, *Bioresource Technology* **151** : 441–444.

Brennan, A., Hoagland, W., Schell, D. and Scott, C. e. (1986). High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering - scale plug flow reactor. Results of low testing solids, *Biotechnol. Bioeng. Symp. ; (United States)*, United States.

Brosse, N., Hussin, M. H. and Rahim, A. A. (2019). Organosolv processes, *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **166** : 153—176.

Brosse, N., Sannigrahi, P. and Ragauskas, A. (2009). Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**(18) : 8328–8334.

Brusseau, M., Ramirez-Andreotta, M., Pepper, I. and Maximillian, J. (2019). Environmental Impacts on Human Health and Well-Being, *Environmental and Pollution Science*, Elsevier, pp. 477–499.

Cadoche, L. and López, G. D. (1989). Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes, *Biological Wastes* **30**(2) : 153–157.

Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R. and Bridgwater, A. V. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **76** : 309–322.

Cardona, C. A., Quintero, J. A. and Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse : Status and perspectives, *Bioresource Technology* **101**(13) : 4754–4766.

Cardona, C. A. and Sanchez, O. J. (2007). Fuel ethanol production : Process design trends and integration opportunities, *Bioresource Technology* **98**(12) : 2415–2457.

Champagne, P. (2008). Chapter 9 - Biomass, *in* T. M. Letcher (ed.), *Future Energy*, Elsevier, Oxford, pp. 151–170.

Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X. and Saddler, J. N. (2007). Substrate Pretreatment : The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics ?, *in* L. Olsson (ed.), *Biofuels*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 67–93.

Chang, V. S., Burr, B. and Holtzapple, M. T. (1997). Lime Pretreatment of Switchgrass, *in* B. H. Davison, C. E. Wyman and M. Finkelstein (eds), *Biotechnology for Fuels and Chemicals : Proceedings of the Eighteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 5–9, 1996, at Gatlinburg, Tennessee*, Applied Biochemistry and Biotechnology, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 3–19.

Chang, V. S., Kaar, W. E., Burr, B. and Holtzapple, M. T. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass, *Biotechnology Letters* **23**(16) : 1327–1333.

Chang, V. S., Nagwani, M. and Holtzapple, M. T. (1998). Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **74**(3) : 135–159.

Charoenchai, C., Fleet, G. H. and Henschke, P. A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts, *American Journal of Enology and Viticulture* **49**(3) : 283–288.

Cherubini, F. (2009). from oil to refinery to biorefinery : production of energy and chemicals form biomasss, *Ital. Biol.* **5** : 46–41.

Cherubini, F. and Strømman, A. H. (2011). Chapter 1 - Principles of Biorefining, *in* A. Pandey, C. Larroche, S. C. Ricke, C.-G. Dussap and E. Gnansounou (eds), *Biofuels*, Academic Press, Amsterdam, pp. 3–24.

Choi, G.-W., Um, H.-J., Kim, Y., Kang, H.-W., Kim, M., Chung, B.-W. and Kim, Y.-H. (2010). Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on cassava starch, *Biomass and Bioenergy* **34**(8) : 1223 – 1231.

Chum, H. L., Douglas, L. J., Feinberg, D. A. and Schroeder, H. A. (1985). Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose. [Organosolv process, wet oxidation, and steam explosion of wood chips], *Technical Report SERI/TR-231-2183*, Solar Energy Research Inst., Golden, CO (USA) ; Colorado State Univ., Fort Collins (USA).

Chundawat, S. P. S., Balan, V. and Dale, B. E. (2008). High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biotechnology and Bioengineering* **99**(6) : 1281–1294.

Cot, M., Loret, M.-O., Franc¸ois, J. and Benbadis, L. (2007). Physiological behaviour of Saccharomyces cerevisiae in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol, *FEMS Yeast Research* **7**(1) : 22–32.

Crop-energies (2016). Bioethanol as a growth market bioethanol-biofuel no. 1 worldwide. available from. http://www.cropenergies.com/Pdf/en/Bioethanol/Markt/Dynamisches_Wachstum.pdf, consulté le 07/01/2020".

Cruz, C., Souza, G. and Cortez, L. (2014). Chapter 11 - Biofuels for transport, *Future Energy*, second edn, Elsevier Ltd., London, UK, pp. 215–244.

Curvelo, A. A. d. S. and Pereira, R. (1995). Kinetics of ethanol-water delignification of sugar cane bagasse, *Proceedings* .

Dale, B. E. and Moreira, M. J. (1982). Freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng. Symp. ; (United States)* **12**.

Daniel, R. M., Finney, J. L., Stoneham, M. and Zaccai, G. (2004). The effect of water on protein dynamics, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences* **359**(1448) : 1269–1275.

Dashtban, M., Schraft, H. and Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues ; Opportunities & Perspectives, *International Journal of Biological Sciences* **5**(6) : 578–595.

Delgenes, J. P., Penaud, V. and Moletta, R. (2003). Pretreatments for the Enhancement of Anaerobic Digestion of Solid Wastes, *ChemInform* **34**(13).

Demain, A. L. and Báez-Vásquez, M. A. (2013). Chapter 14 - Biofuels of the Present and the Future, *in* S. L. Suib (ed.), *New and Future Developments in Catalysis*, Elsevier, Amsterdam, pp. 325–370.

Demirbas, A. (2008). The Importance of Bioethanol and Biodiesel from Biomass, *Energy Sources, Part B : Economics, Planning, and Policy* **3**(2) : 177–185.

Ding, S.-Y., Xu, Q., Crowley, M., Zeng, Y., Nimlos, M., Lamed, R., Bayer, E. A. and Himmel, M. E. (2008). A biophysical perspective on the cellulosome : new opportunities for biomass conversion, *Energy biotechnology / Environmental biotechnology* **19**(3) : 218–227.

Duff, S. J. B. and Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol : A review, *Bioresource Technology* **55**(1) : 1–33.

Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F. and Almazan, O. (2009). Biofuels : Environment, technology and food security, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **13**(6) : 1275–1287.

Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J. and Penner, M. H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass, *Bioresource Technology* **59**(2) : 129–136.

Esteghlalian, A. R., Bilodeau, M., Mansfield, S. D. and Saddler, J. N. (2001). Do Enzymatic Hydrolyzability and Simons' Stain Reflect the Changes in the Accessibility of Lignocellulosic Substrates to Cellulase Enzymes ?, *Biotechnology Progress* **17**(6) : 1049–1054.

Faulds, C. B., Robertson, J. A. and Waldron, K. W. (2008). Effect of ph on the solubilization of brewers' spent grain by microbial carbohydrases and proteases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(16) : 7038–7043. PMID : 18680377.

Felby, C., Thygesen, L. G., Kristensen, J. B., Jørgensen, H. and Elder, T. (2008). Cellulose–water interactions during enzymatic hydrolysis as studied by time domain NMR, *Cellulose* **15**(5) : 703–710.

Fengel, D. and Wegener, G. (2011). *Wood : chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de Gruyter. Google-Books-ID : x1B4uITKnt0C.

Fleet, G. H. and Heard, G. M. (1993). Yeasts-growth during fermentation, *in* G. H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and biotechnology*, Harwood Academic, Switzerland, pp. 42–43.

Fradinho, D. M., Neto, C. P., Evtuguin, D., Jorge, F. C., Irle, M. A., Gil, M. H. and Pedrosa de Jesus, J. (2002). Chemical characterisation of bark and of alkaline bark extracts from maritime pine grown in Portugal, *Industrial Crops and Products* **16**(1) : 23–32.

Galbe, M. and Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **108** : 41–65.

García-Aparicio, M. P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J. M., Ballesteros, M. and Negro, M. J. (2006). Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129**(1) : 278–288.

García, I. L. (2016). 5 - Feedstocks and challenges to biofuel development, *in* R. Luque, C. S. K. Lin, K. Wilson and J. Clark (eds), *Handbook of Biofuels Production (Second Edition)*, Woodhead Publishing, pp. 85–118.

García-Olivares, A., Solé, J. and Osychenko, O. (2018). Transportation in a 100 % renewable energy system, *Energy Conversion and Management* **158** : 266–285.

Gawand, P., Hyland, P., Ekins, A., Martin, V. J. J. and Mahadevan, R. (2013). Novel approach to engineer strains for simultaneous sugar utilization, *Metabolic Engineering* **20** : 63–72.

globalpetrolprices.com (2019). Prix de l'éthanol, litre, 30-déc-2019. https://fr.globalpetrolprices.com/ethanol_prices/, consulté le 07/01/2020".

Godin, B., Ghysel, F., Agneessens, R., Schmit, T., Gofflot, S., Lamaudière, S., Sinnaeve, G., Goffart, J.-P., Gerin, P. A., Stilmant, D. and Delcarte, J. (2010). Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* p. 12.

Gruno, M., Väljamäe, P., Pettersson, G. and Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate, *Biotechnology and Bioengineering* **86**(5) : 503–511.

Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., and Siddiqui, K. S. (2015). Lignocellulosic biomass : Biosynthesis, degradation, and industrial utilization, *Engineering in Life Sciences* pp. 1–16.

Guimarães, J. L., Frollini, E., da Silva, C. G., Wypych, F. and Satyanarayana, K. G. (2009). Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil, *Industrial Crops and Products* **30**(3) : 407–415.

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, *Bioresource Technology* **100**(3) : 1214 – 1220.

Ha, M. A., Apperley, D. C., Evans, B. W., Huxham, I. M., Jardine, W. G., Viëtor, R. J., Reis, D., Vian, B. and Jarvis, M. C. (1998). Fine structure in cellulose microfibrils : NMR evidence from onion and quince, *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* **16**(2) : 183–190.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. and Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains, *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(5) : 937–953.

Harner, N. K., Wen, X., Bajwa, P. K., Austin, G. D., Ho, C.-Y., Habash, M. B., Trevors, J. T. and Lee, H. (2015). Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **42**(1) : 1–20.

Harris, E. E. (1949). Wood Saccharification, Vol. 4 of *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, pp. 153 – 188.

Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi : production and role from in lignin degradation, *FEMS Microbiology Reviews* **13**(2-3) : 125–135.

Hawkins, S. J. (2012). Marine conservation in a rapidly changing world, *Aquatic Conservation : Marine and Freshwater Ecosystems* **22**(3) : 281–287.

He, K., Huo, H., Zhang, Q., He, D., An, F., Wang, M. and Walsh, M. P. (2005). Oil consumption and CO_2 emissions in China's road transport : current status, future trends, and policy implications, *Energy Policy* **33**(12) : 1499–1507.

Heerden, J., Botha, J. and Roets, P. (2002). Comparison between Sasol fuel alcohol and pure ethanol as a gasoline oxygenate, *Presentation to the XIV International Symposium on Alcohol Fuels* .

Hendriks, A. T. W. M. and Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology* **100**(1) : 10–18.

Holtzapple, M. and Humphrey, A. (1984). The effect of organosolv pretreatment on the enzymic hydrolysis of poplar, *Biotechnol Bioeng* **26 :** : 670–676.

Holtzapple, M. T., Lundeen, J. E., Sturgis, R., Lewis, J. E. and Dale, B. E. (1992). Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX), *Applied Biochemistry and Biotechnology* **34**(1) : 5.

Huber, G. W. and Corma, A. (2007). Synergies between Bio- and Oil Refineries for the Production of Fuels from Biomass, *Angewandte Chemie International Edition* **46**(38) : 7184–7201.

Hughes, L. (2000). Biological consequences of global warming : is the signal already apparent ?, *Trends in Ecology & Evolution* **15**(2) : 56–61.

IEA (2019). International energy agency 2017. https://www.iea.org/fuels-and-technologies/bioenergy, consulté le 07/01/2020".

IFPEN (2017). Quel avenir pour les biocarburants ? https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energies-renouvelables/quel-avenir-les-biocarburants, consulté le 07/01/2020".

IFPEN (2019). Les biocarburants dans le secteur des transports routiers. https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/article/tableau-bord-biocarburants-2019, consulté le 07/01/2020".

IRENA (2013). Bioethanol. https://www.irena.org/publications/2015/Nov/REthinking-Energy-Renewable-Energy-and-Climate-Change, consulté le 31/12/2019".

Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M. and Watanabe, T. (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi, *Journal of Biotechnology* **103**(3) : 273–280.

Jia, S., Peng, H., Liu, S. and Zhang, X. (2009). Review of Transportation and Energy Consumption Related Research, *Journal of Transportation Systems Engineering and Information Technology* **9**(3) : 6–16.

Kang, X., Kirui, A., Dickwella Widanage, M. C., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. J. and Wang, T. (2019). Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR, *Nature Communications* **10**(1) : 347.

Kaya, F., Heitmann, J. A. and Joyce, T. W. (2000). Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan, *Journal of Biotechnology* **80**(3) : 241–247.

Keating, J. D., Panganiban, C. and Mansfield, S. D. (2006). Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds, *Biotechnology and Bioengineering* **93**(6) : 1196–1206.

Kim, K. H. and Hong, J. (2001). Supercritical CO2 pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis, *Bioresource Technology* **77**(2) : 139–144.

Kim, M. and Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**(7) : 803–807.

Kim, S. B., Yum, D. M. and Park, S. C. (2000). Step-change variation of acid concentration in a percolation reactor for hydrolysis of hardwood hemicellulose, *Bioresource Technology* **72**(3) : 289–294.

Kim, T. H., Nghiem, N. P. and Hicks, K. B. (2009). Pretreatment and Fractionation of Corn Stover by Soaking In Ethanol and Aqueous Ammonia, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **153**(1) : 171–179.

Kirk-Othmer (2001). *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 27 Volume Set, 5th edn, Wiley.

Kleinert, T. (1974). Organolv pupling with aqueous alcohol., *Tappi Journal* **57** : 99.

Klinke, H. B., Ahring, B. K., Schmidt, A. S. and Thomsen, A. B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw, *Bioresource technology* .

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, *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**(1) : 10–26.

Kohlmann, K. L., Sarikaya, A., Westgate, P. J., Weil, J., Velayudhan, A., Hendrickson, R. and Ladisch, M. R. (1995). Enhanced Enzyme Activities on Hydrated Lignocellulosic Substrates, *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, Vol. 618 of *ACS Symposium Series*, American Chemical Society, pp. 237–255.

Kristensen, J. B., Felby, C. and Jørgensen, H. (2009). Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biotechnology for Biofuels* **2**(1) : 11.

Kumar, R. and Wyman, C. E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies, *Biotechnology Progress* **25**(2) : 302–314.

Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M. and Adhikari, D. K. (2009). Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass, *Chemical Engineering & Technology* **32**(4) : 517–526.

LaForge, F. B. and Hudson, C. S. (1918). The Preparation of Several Useful Substances from Corn Cobs., *Journal of Industrial & Engineering Chemistry* **10**(11) : 925–927.

Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P. and Laopaiboon, P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(10) : 1497–1501.

Lascelles, B., Sciara, G. N. D., Agardy, T., Cuttelod, A., Eckert, S., Glowka, L., Hoyt, E., Llewellyn, F., Louzao, M., Ridoux, V. and Tetley, M. J. (2014). Migratory marine species : their status, threats and conservation management needs, *Aquatic Conservation : Marine and Freshwater Ecosystems* **24**(S2) : 111–127.

Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, *Journal of Biotechnology* **56**(1) : 1–24.

Li, H., Kim, N.-J., Jiang, M., Kang, J. W. and Chang, H. N. (2009). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid–acetone for bioethanol production, *Bioresource Technology* **100**(13) : 3245 – 3251.

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. and Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, *Biomass and Bioenergy* **47** : 395–401.

Lindmark, M., Bergquist, A.-K. and Andersson, L. F. (2011). Energy transition, carbon dioxide reduction and output growth in the Swedish pulp and paper industry : 1973–2006, *Energy Policy* **39**(9) : 5449–5456.

Lindner, A. and Wegener, G. (1988). Characterization of Lignins from Organosolv Pulping According to the Organocell Process Part 1. Elemental Analysis, Nonlignin Portions and Functional Groups, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **8**(3) : 323–340.

Lindner, A. and Wegener, G. (1989). Characterization of Lignins from Organosolv Pulping According to the Organocell Process, Part 2. Residual Lignins, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **9**(4) : 443–465.

Lindner, A. and Wegener, G. (1990). Characterization of Lignins from Organosolv Pulping According to the Organocell Process. Part 3. Permanganate Oxidation and Thioacidolysis, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **10**(3) : 331–350.

Liu, R. and Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized Saccharomyces cerevisiae (CICC 1308), *Bioresource Technology* **99**(4) : 847–854.

Luo, X. and Zhu, J. (2011). Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses, *Enzyme and Microbial Technology* **48**(1) : 92–99.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. v. and Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(3) : 506–577.

Magris, R. A., Pressey, R. L., Weeks, R. and Ban, N. C. (2014). Integrating connectivity and climate change into marine conservation planning, *Biological Conservation* **170** : 207–221.

Malherbe, S. and Cloete, T. (2002). Lignocellulose biodegradation : Fundamentals and applications, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **1**(2) : 105–114.

Mandels, M. and Reese, E. T. (1965). Inhibition of Cellulases, *Annual Review of Phytopathology* **3**(1) : 85–102.

Marker, T. L. (2005). Opportunities for biorenewables in oil refineries.

McDonough, T. J. (1992). The chemistry of organosolv delignification.

McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Vol. 566 of *ACS Symposium Series*, American Chemical Society, pp. 292–324.

Menon, V. and Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose : Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science* **38**(4) : 522–550.

Merino, S. T. and Cherry, J. (2007). Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization, *in* L. Olsson (ed.), *Biofuels*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 95–120.

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, *Biochemistry and Biophysics Reports* **10** : 52–61.

Mok, W. S. L. and Antal, M. J. (1992). Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **31**(4) : 1157–1161.

Mok, W. S.-L. and Antal, M. J. (1993). Biomass Fractionation by Hot Compressed Liquid Water, *in* A. V. Bridgwater (ed.), *Advances in Thermochemical Biomass Conversion*, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1572–1582.

Monrroy, M., Ibañez, J., Melin, V., Baeza, J., Mendonça, R. T., Contreras, D. and Freer, J. (2010). Bioorganosolv pretreatments of P. radiata by a brown rot fungus (Gloephyllum trabeum) and ethanolysis, *Enzyme and Microbial Technology* **47**(1) : 11–16.

Morone, A. and Pandey, R. A. (2014). Lignocellulosic biobutanol production : Gridlocks and potential remedies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **37** : 21–35.

Morrison, D., van Dyk, J. S. and Pletschke, B. I. (2011). The effect of alcohols, lignin and phenolic compounds on the enzyme activity of *clostridium*, p. 10.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology* **96**(6) : 673–686.

Moulthrop, J. S., P. Swatloski, R., Moyna, G. and D. Rogers, R. (2005). High-resolution 13c NMR studies of cellulose and cellulose oligomers in ionic liquid solutions, *Chemical Communications* **0**(12) : 1557–1559.

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. and Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels : A comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(2) : 578–597.

Neilson, M. J., Shafizadeh, F., Aziz, S. and Sarkanen, K. V. (1983). Evaluation of organosolv pulp as a suitable substrate for rapid enzymatic hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering* **25**(2) : 609–612.

Nguyen, L. M. (2000). Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters, *Ecological Engineering* **16**(2) : 199–221.

Nyachaka, C., Yawas, D. and Pam, G. (2013). Production and performance evaluation of bioethanol fuel from groundnuts shell waste, *Am. J. Eng. Res.* **2**(12) : 303–312.

Ohgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J. and Zacchi, G. (2007). A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover, *Process Biochemistry* **42**(5) : 834–839.

Ojaveer, H., Galil, B. S., Minchin, D., Olenin, S., Amorim, A., Canning-Clode, J., Chainho, P., Copp, G. H., Gollasch, S., Jelmert, A., Lehtiniemi, M., McKenzie, C., Mikuš, J., Miossec, L., Occhipinti-Ambrogi, A., Pećarević, M., Pederson, J., Quilez-Badia, G., Wijsman, J. W. M. and Zenetos, A. (2014). Ten recommendations for advancing the assessment and management of non-indigenous species in marine ecosystems, *Marine Policy* **44** : 160–165.

O'sulivan, A. C. (1997). Cellulose : the structure slowly unravels, *Cellulose* **4**(3) : 173–207.

Palmowski, L. M. and Müller, J. A. (1999). Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion, *Water Science and Technology* **41**(3) : 155–162.

Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I : inhibition and detoxification, *Bioresource Technology* **74**(1) : 17–24.

Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X. and Saddler, J. (2005). Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping : Preliminary evaluation

of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products, *Biotechnology and Bioengineering* **90**(4) : 473–481.

Pan, X., Gilkes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D. and Saddler, J. (2006). Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process : optimization of process yields, *Biotechnology and Bioengineering* **94**(5) : 851–861.

Pan, X. and Sano, Y. (2005). Fractionation of wheat straw by atmospheric acetic acid process, *Bioresource Technology* **96**(11) : 1256–1263.

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, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124**(1-3) : 1069–1080.

Pan, X., Xie, D., Yu, R. W., Lam, D. and Saddler, J. N. (2007). Pretreatment of Lodgepole Pine Killed by Mountain Pine Beetle Using the Ethanol Organosolv Process : Fractionation and Process Optimization, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **46**(8) : 2609–2617.

Peng, L. and Chen, Y. (2011). Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (shf) using saccharomyces cerevisiae, *Biomass and Bioenergy* **35**(4) : 1600 – 1606. Socioeconomic Dimensions of US Bioenergy.

Phisalaphong, M., Srirattana, N. and Tanthapanichakoon, W. (2006). Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation, *Biochemical Engineering Journal* **28**(1) : 36–43.

Polaina, J. and Maccabe, A. P. (2010). Industrial Enzymes : Structure, Function and Applications.

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. and Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi : properties and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**(5) : 577–591.

Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues, *Resources, Conservation and Recycling* **50**(1) : 1–39.

Pu, Y., Jiang, N. and Ragauskas, A. J. (2007). Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **27**(1) : 23–33.

Pye, E. K. R. T. I. (1990). The ALCELL process : a proven alternative to kraft pulping, *Pulping Conference : [proceedings] (USA)* .

Qing, Q. and Wyman, C. E. (2011). Hydrolysis of different chain length xylooliogmers by cellulase and hemicellulase, *Bioresource Technology* **102**(2) : 1359–1366.

Qing, Q., Yang, B. and Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes, *Bioresource Technology* **101**(24) : 9624–9630.

Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials, *Química Nova* **26**(6) : 863–871.

Roche, C. M., Dibble, C. J. and Stickel, J. J. (2009). Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings, *Biotechnology for Biofuels* **2**(1) : 28.

Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., Ding, K., Peng, P., Addy, M., Cheng, Y., Anderson, E., Wang, Y., Liu, Y., Lei, H. and Li, B. (2019). Biofuels : Introduction, *Biofuels : Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*, Elsevier, pp. 3–43.

Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels, *Nature* **454**(7206) : 841–845.

Rughani, J. and McGinnis, G. D. (1989). Combined rapid-steam hydrolysis and organosolv pretreatment of mixed southern hardwoods, *Biotechnology and Bioengineering* **33**(6) : 681–686.

Samaniuk, J. R., Tim Scott, C., Root, T. W. and Klingenberg, D. J. (2011). The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions, *Bioresource Technology* **102**(6) : 4489–4494.

Seisto, A., Poppius-Levlin, K. and T., J. (1997). Peroxyformic acid pulping of nonwood plants by the milox method. 1. pulping and bleaching, **80**(9) : 215–221.

Selig, M. (2008). *Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass laboratory analytical procedure (LAP) : issue date, 3/21/2008 /*, National Renewable Energy Laboratory,, Golden, Colo. :.

Senior, D. J., Mayers, P. R. and Saddler, J. N. (1991). The interaction of xylanases with commercial pulps, *Biotechnology and Bioengineering* **37**(3) : 274–279.

Sewalt, V. J. H., Glasser, W. G. and Beauchemin, K. A. (1997). Lignin impact on fiber degradation. 3. reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(5) : 1823–1828.

Shahzadi, T., Mehmood, S., Irshad, M., Anwar, Z., Afroz, A., Zeeshan, N., Rashid, U. and Sughra, K. (2014). Advances in lignocellulosic biotechnology : A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases, *Advances in Bioscience and Biotechnology* **05**(03) : 246.

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, *Bioresource Technology* **98**(16) : 3000–3011.

Soccol, C. R., Faraco, V., Karp, S. G., Vandenberghe, L. P., Thomaz-Soccol, V., Woiciechowski, A. L. and Pandey, A. (2019). Chapter 14 - Lignocellulosic Bioethanol : Current Status and Future Perspectives, *in* A. Pandey, C. Larroche, C.-G. Dussap, E. Gnansounou, S. K. Khanal and S. Ricke (eds), *Biofuels : Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition)*, Academic Press, pp. 331–354.

Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S. C. and Long, S. P. (2010). Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels, *Science* **329**(5993) : 790–792.

Staniszewski, M., Kujawski, W. and Lewandowska, M. (2007). Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions, *Journal of Food Engineering* **82**(4) : 618–625.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review, *Bioresource Technology* **83**(1) : 1–11.

Sánchez-Acuña, J. C., Granados-Gómez, M. M., Navarrete-Rodríguez, L. F., Rangel-Peraza, J. G. and Bustos-Terrones, Y. A. (2018). Obtaining Bioethanol through Hydrolytic Treatment of Agro-Industrial Banana Residues, *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* **7**(1) : 60–72.

Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Lidén, G. (1999). Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**(2) : 169–174.

Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production : A Review, *International Journal of Molecular Sciences* **9**(9) : 1621–1651.

Takács, E., Wojnárovits, L., Földváry, C., Hargittai, P., Borsa, J. and Sajó, I. (2000). Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose, *Radiation Physics and Chemistry* **56**(3-6) : 399–403.

Tamers, M. (2006). Distinguishing Between Bio-ethanol and Petroleum Ethanol, *Ethanol Producer Magazine* .

Teramoto, Y., Lee, S.-H. and Endo, T. (2008). Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking, *Bioresource Technology* **99**(18) : 8856–8863.

Thring, R. W., Chornet, E. and Overend, R. P. (1990). Recovery of a solvolytic lignin : Effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature, *Biomass* **23**(4) : 289–305.

Torget, R., Himmel, M. and Grohmann, K. (1992). Dilute-acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crops : Scientific Note, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **34-35**(1) : 115–123.

Tribot, A., Amer, G., Abdou Alio, M., de Baynast, H., Delattre, C., Pons, A., Mathias, J.-D., Callois, J.-M., Vial, C., Michaud, P. and Dussap, C.-G. (2019). Wood-lignin : Supply, extraction processes and use as bio-based material, *European Polymer Journal* **112** : 228–240.

Vares, T., Lundell, T. K. and Hatakka, A. I. (1993). Production of multiple lignin peroxidases by the white-rot fungus *Phlebia ochraceofulva*, *Enzyme and Microbial Technology* **15**(8) : 664–669.

Vegter, A. C., Barletta, M., Beck, C., Borrero, J., Burton, H., Campbell, M. L., Costa, M. F., Eriksen, M., Eriksson, C., Estrades, A., Gilardi, K. V. K., Hardesty, B. D., Sul, J. A. I. d., Lavers, J. L., Lazar, B., Lebreton, L., Nichols, W. J., Ribic, C. A., Ryan, P. G., Schuyler, Q. A., Smith, S. D. A., Takada, H., Townsend, K. A., Wabnitz, C. C. C., Wilcox, C., Young, L. C. and Hamann, M. (2014). Global research priorities to mitigate plastic pollution impacts on marine wildlife, *Endangered Species Research* **25**(3) : 225–247.

Vlasenko, E. Y., Ding, H., Labavitch, J. M. and Shoemaker, S. P. (1997). Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw, *Bioresource Technology* **59**(2) : 109–119.

Wang, W., Kang, L., Wei, H., Arora, R. and Lee, Y. Y. (2011). Study on the Decreased Sugar Yield in Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrate at High Solid Loading, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **164**(7) : 1139–1149.

Wasserscheid, P. and Keim, W. (2000). Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis, *Angewandte Chemie International Edition* **39**(21) : 3772–3789.

Weil, J., Brewer, M., Hendrickson, R., Sarikaya, A. and Ladisch, M. R. (1998). Continuous pH Monitoring During Pretreatment of Yellow Poplar Wood Sawdust by Pressure Cooking in Water, Applied Biochemistry and Biotechnology, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 99–111.

Wen, J.-L., Sun, S.-L., Yuan, T.-Q., Xu, F. and Sun, R.-C. (2013). Structural elucidation of lignin polymers of eucalyptus chips during organosolv pretreatment and extended delignification, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(46) : 11067–11075.

Wenzl, H. F. (1970). IV - The Acid Hydrolysis of Wood, *in* H. F. Wenzl (ed.), *The Chemical Technology of Wood*, Academic Press, pp. 157–252.

Wright, J. (1988). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis, *Chem. Eng. Prog. ; (United States)* **84 :8**.

Wu, W. (2007). The situation of energy consumption and emission, *Energy of China* **29**(10) : 19–23.

Wyman, C. E. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol, *Trends in biotechnology* .

Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R. and Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresource Technology* **96**(18) : 1959–1966.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J. and Saddler, J. N. (2004). Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β-Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates, *in* M. Finkelstein, J. D. McMillan, B. H. Davison and B. Evans (eds), *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO*, Biotechnology for Fuels and Chemicals, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1115–1126.

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B. and Ladisch, M. (2011). Deactivation of cellulases by phenols, *Enzyme and Microbial Technology* **48**(1) : 54–60.

Yang, B. and Wyman, C. E. (2004). Effect of xylan and lignin removal by batch and flow-through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose, *Biotechnology and Bioengineering* **86**(1) : 88–98.

Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R. and Nasrulhaq Boyce, A. (2014). Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice, *The Scientific World Journal* **2014** : 1–11.

Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J. and Spiess, A. C. (2009). High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose, *Bioresource Technology* **100**(9) : 2580–2587.

Zhang, K., Pei, Z. and Wang, D. (2016). Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals : A review, *Bioresource Technology* **199** : 21–33.

Zhang, Y.-H. P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**(5) : 367–375.

Zhang, Y.-H. P. and Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose : Noncomplexed cellulase systems, *Biotechnology and Bioengineering* **88**(7) : 797–824.

Zhang, Y.-H. P. and Lynd, L. R. (2006). A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase, *Biotechnology and Bioengineering* **94**(5) : 888–898.

Zhao, X., Cheng, K. and Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**(5) : 815–827.

Zhao, X. and Liu, D. (2010). Chemical and thermal characteristics of lignins isolated from Siam weed stem by acetic acid and formic acid delignification, *Industrial Crops and Products* **32**(3) : 284–291.

Zheng, Y., Lin, H.-M., Wen, J., Cao, N., Yu, X. and Tsao, G. T. (1995). Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis, *Biotechnology Letters* **17**(8) : 845–850.

Zhou, Z., Lei, F., Li, P. and Jiang, J. (2018). Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals : A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology, *Biotechnology and Bioengineering* **115**(11) : 2683–2702.

Zhu, J. Y., Pan, X. and Zalesny, R. S. (2010). Pretreatment of woody biomass for biofuel production : energy efficiency, technologies, and recalcitrance, *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(3) : 847–857.

Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., Ding, Y. and Wu, G. (2006). Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application : a mini-review, *Green Chemistry* **8**(4) : 325–327.

Zhu, Y., Lee, Y. Y. and Elander, R. T. (2005). Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124**(1) : 1045–1054.

Zhua, J. Y., Wang, G. S., Pan, X. J. and Gleisner, R. (2009). Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification, *Chemical Engineering Science* **64**(3) : 474–485.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

« Le savant est l'homme par lequel s'opère facilement la distinction entre la franchise et le mensonge dans les paroles, entre la vérité et l'erreur dans les convictions entre la beauté et la laideur dans les actes. »

Abd El-Kader

Sommaire

II.1 Matière première : sciures de bois 76

II.2 Caractérisation physico-chimique de la biomasse lignocellulosique (BLC) 77

II.2.1 Détermination du taux d'humidité 78

II.2.2 Séchage de la matière première 78

II.2.3 Prétraitement mécanique : tamisage 78

II.2.4 Dosage des extractibles 79

II.2.5 Dosage du taux de cendres 79

II.2.6 Séparation de l'holocellulose par délignification 80

II.2.7 Dosage de l'α-cellulose 81

II.2.8 Dosage de l'hémicellulose 82

II.2.9 Dosage de la lignine de Klason ou lignine insoluble 82

II.2.10 Dosage de la lignine soluble dans l'acide LSA 83

II.3 Prétraitement Organosolv 84

II.3.1 Réacteur de prétraitement : Monowave 450 84

II.3.2 Mise en œuvre du prétraitement Organosolv 85

II.4 Post-traitements à la cuisson Organosolv 86

II.4.1 Dosages chimiques sur le résidu solide (pâte) 87

II.4.2 Dosage des produits de dégradation : inhibiteurs 88

II.4.3 Précipitation de la lignine Organosolv 88

II.5 Hydrolyse enzymatique 89
II.5.1 Substrats 89
II.5.2 Tampon 89
II.5.3 Cocktail enzymatique 89
II.5.3.1 Mesure de l'activité cellulase 90
II.5.3.2 Dosage des protéines 90
II.5.4 Conditions opératoires de conduite d'hydrolyse 90
II.5.5 Suivi d'hydrolyse 91
II.5.5.1 Dosage des sucres et composés acides par HPLC 91
II.5.5.2 Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS 92
II.6 Fermentation alcoolique : production de bioéthanol 92
II.6.1 Souche de *Saccharomyces cerevisiae* 92
II.6.2 Milieux de culture 93
II.6.3 Matériel de culture et conditions 93
II.6.4 Suivi de fermentation 93
Bibliographie 94

Préambule

Comme mentionné dans le chapitre I, ce chapitre met l'accent sur la description des outils expérimentaux utilisés dans cette étude. De ce fait, il est subdivisé en quatre parties fondamentales.

La première partie s'appuie sur la description de la matière première lignocellulosique régionale utilisée pour l'étude. Afin de caractériser finement cette dernière, la mise au point de nombreux protocoles de dosage des fractions de la biomasse a été nécessaire. A cet effet, des protocoles d'analyses quantitatives ont été élaborés et adaptés aux matériels existant au laboratoire. Cela a également nécessité l'acquisition de petits matériels dédiés (verrerie de laboratoire, réactifs spécifiques. . .) et la prise en main de nombreux appareils d'analyse (HPLC, spectrophotomètre,etc.).

La deuxième partie décrit le matériel utilisé et les conditions générales de la conduite du prétraitement Organosolv, ainsi que la mise au point de protocoles d'analyses des produits de dégradation qui peuvent être formés lors du prétraitement et constituer de potentiels inhibiteurs de fermentation.

La troisième partie est consacrée en premier lieu à la description du dispositif expérimental utilisé pour l'hydrolyse enzymatique, puis elle exposera les conditions générales de conduite des expériences, le substrat et les enzymes utilisés ; une description des outils de caractérisation biochimique et physique de cette étape sera proposée en deuxième lieu.

Enfin, la dernière partie est dédiée à la description du déroulement de l'étape de fermentation alcoolique pour la production d'éthanol ; elle présentera la souche utilisée, le milieu de culture, le type de réacteur mis en jeu et les principales techniques d'analyses pour le suivi de la fermentation.

La Figure II.1 illustre la série des opérations nécessaires à la bioconversion de la matière lignocellulosique en bioéthanol.

II.1 Matière première : sciures de bois

Pour cette étude, la matière première choisie est un mélange de sciure de bois de quatre essences de résineux : sapin, épicéa (*Picea abie*), pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et sapin de Douglas (*Douglas Fir*). Le mélange a été fourni par une scierie locale (Les Scieries du Centre Marcel Esbelin et Cie), située à Cournon d'Auvergne dans le département du Puy-de-Dôme (France). Le mélange a été extrait d'une matière première mensuelle. La Figure II.2 illustre l'aspect visuel et physique de la matière première sous forme de sciure.

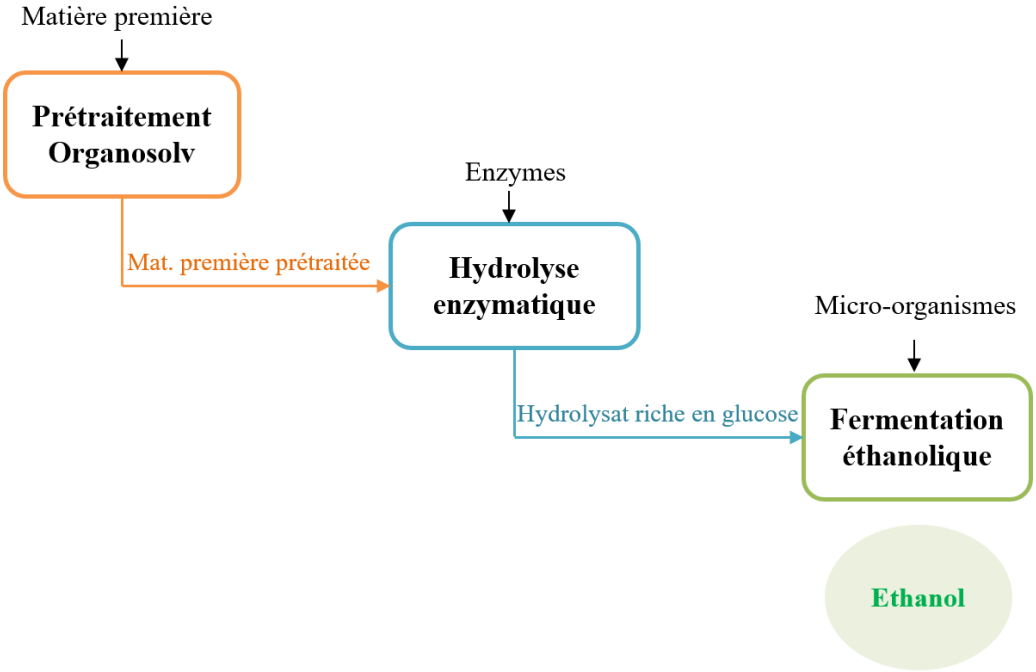


FIGURE II.1: Schéma explicatif des étapes de bioconversion de la BLC en bioéthanol

FIGURE II.2: Photographie de la matière première utilisée dans ce travail : sciure de bois

II.2 Caractérisation physico-chimique de la biomasse lignocellulosique (BLC)

Afin d'appréhender notre matière (la sciure de bois), il est nécessaire de la caractériser en déterminant sa composition en cellulose, en hémicelluloses, en extractibles, en lignine Klason et en cendres. Ainsi, la majorité des dosages pour quantifier les différentes fractions a été conduite selon les procédures normalisées Tappi-249 «Laboratory Analytical Procedure» (LAP) décrites par le «National Renewable Energy Laboratory» (NREL).
Ces méthodes de dosage décrivent une procédure d'extraction du bois pour une analyse plus approfondie, comme celle de l'holocellulose, de l'hémicellulose, de la cellulose et de la lignine. De fait, la composition chimique de la sciure de bois est donnée par la relation suivante :

Sciure de bois = Extractibles + holocellulose + lignine + cendres

L'holocellulose est la fraction englobant les fractions cellulosiques et hémicellulosiques.

La Figure II.3 met en évidence le schéma des opérations de caractérisation de notre matière première.

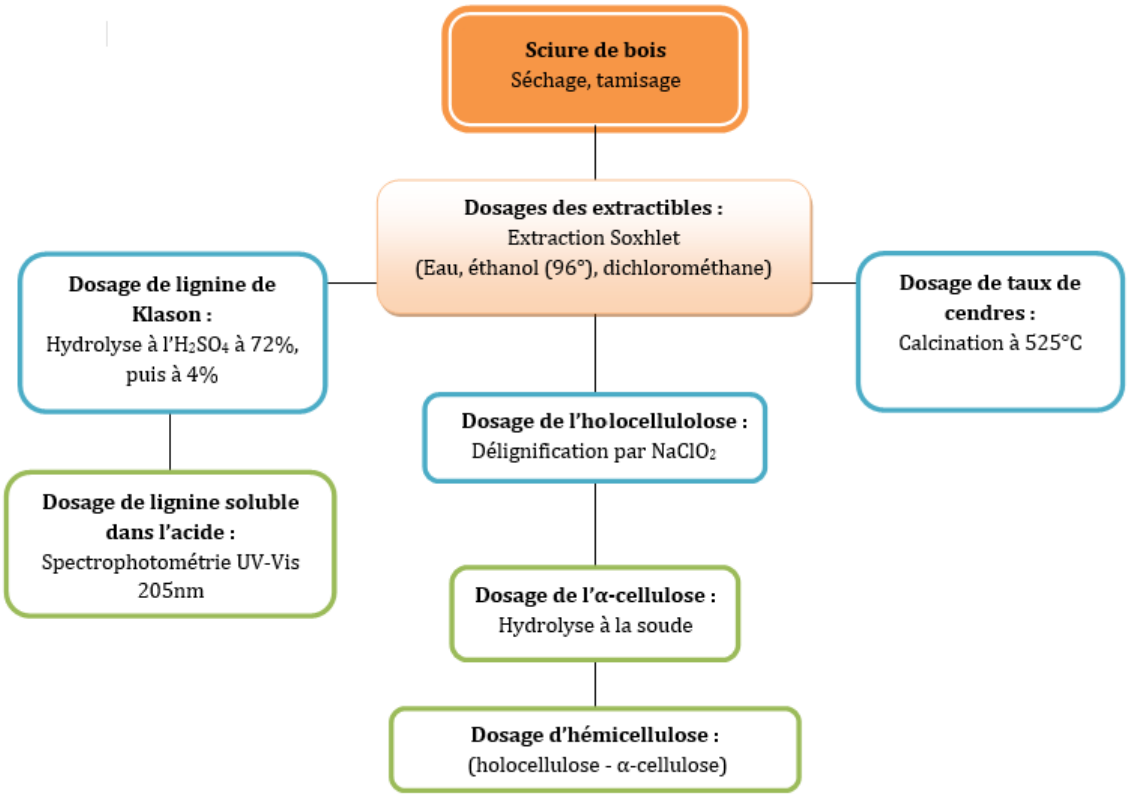


FIGURE II.3: Schéma de la suite des opérations de fractionnement de la BLC

II.2.1 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la sciure est défini comme le rapport de la masse totale d'eau de la biomasse sur sa masse totale. Le taux d'humidité de notre matière première a été déterminée avant le début des expériences par l'intermédiaire d'une balance à infrarouge (Precisa HA300, France). Un chauffage par lumière infrarouge à une température de 110 °C a donc été appliqué pendant 15 minutes et le taux d'humidité est donné directement par la balance qui tient compte de la masse initiale et de la masse finale.

II.2.2 Séchage de la matière première

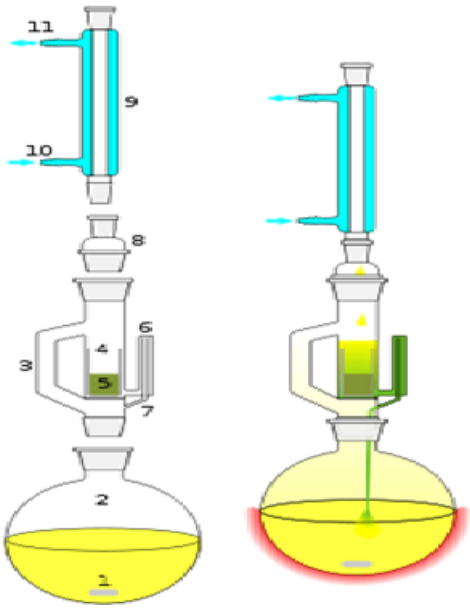
Le taux d'humidité de la sciure de bois étant de 40 % à l'issue de sa détermination, une étape de séchage s'est donc avérée nécessaire pour éliminer l'eau. Cela pourrait palier à la difficulté de manipulation expérimentale d'un substrat humide, mais pourrait également palier l'obtention de biais dans nos résultats. A cet effet, un séchage à l'étuve a été conduit, une alternative au séchage à l'air qui prendrait plus de temps. L'étape de séchage a consisté à sécher une grande quantité de sciure de bois à l'étuve (BINDER ED23, France) à une température de 110 °C jusqu'à ce que la matière atteigne une masse constante, vérifiée par pesée toutes les 12 heures pendant 72 heures. Cette méthode est utilisée en standard pour obtenir la masse sèche de produits animaux, d'algues ou de sédiments.
Dans le cadre de cette thèse, tous les travaux expérimentaux liés à l'étape de prétraitement ont été réalisés sur la base d'un substrat à 99 % constitué de matière sèche.

II.2.3 Prétraitement mécanique : tamisage

La sciure de bois est tout d'abord débarrassée de tout autre résidu présent (écorces, cailloux etc..), puis séchée. Le fractionnement par taille est réalisé à l'aide d'un appareil de tamisage vibratoire, électromagnétique (Controlab, EN 932-5). Celui-ci permet de récupérer les fractions de sciures de bois de différentes tailles. 8 tamis sont utilisés et sont classés en fonction du diamètre de coupure décroissant : 2 - 1,6 - 1,25 - 1 - 0,8 - 0,63 - 0,4 - 0,2 mm.
A cet effet, 3,2 kg de sciure de bois sont placés sur le tamis supérieur du tamiseur. Celui-ci est agité à une amplitude de 1,50 mm/g pendant 14 minutes. Le poids de matière retenu en fin d'opération sur chaque tamis ou refus est déterminé par pesée. Le pourcentage de retenu est ensuite estimé, ce qui donne accès à la distribution granulométrique du mélange de sciure. Pour le bioprocédé, la sciure de bois de taille moyenne comprise entre 0,5 et 1 mm a été utilisée. Des tailles plus grandes auraient engendré des difficultés de manipulation lors de la mise en tube pour le prétraitement, et des tailles plus petites seraient sujettes à une dégradation rapide lors du prétraitement, en plus de constituer un risque de colmatage de pores lors des étapes de filtration intermédiaires.

II.2.4 Dosage des extractibles

Une extraction des sciures de bois à l'aide de solvants organiques ou aqueux permet de récupérer les tanins, les huiles, les graisses, les résines et les cires qui sont regroupés sous la dénomination d'extractibles (TAPPI Standard T204 cm-97, 1997). Les extractibles sont extraits à chaud à l'aide d'un montage d'extraction à reflux composé d'un ballon de 500 mL dans lequel sont introduits 300 mL du solvant extracteur et d'un appareil nommé Soxhlet surmonté d'un réfrigérant (Figure II.4).



1	Agitateur magnétique
2	Ballon à col rodé
3	Retour de distillation
4	Corps en verre
5	Filtre
6	Haut du siphon
7	Sortie du siphon
8	Adaptateur d'expansion
9	Condenseur
10	Entrée de l'eau de refroidissement
11	Sortie de l'eau de refroidissement

FIGURE II.4: Extracteurs Soxhlet

Dans le Soxhlet, une cartouche (N° 5 sur le schéma) est insérée dans laquelle environ 5 g de sciures de bois séchée sont introduits. Un morceau de coton est placé au-dessus des échantillons, afin d'éviter que les sciures de bois ne soient entraînées par siphonnage. L'extraction est réalisée pendant 4 à 8 heures à la température d'ébullition du solvant utilisé. A la fin, la cartouche contenant la sciure extraite est séchée à l'étuve pendant 12 h à 110 °C, puis pesée. Le pourcentage de composés extractibles de sciure de bois est donné par la relation ci-dessous :

$$\textbf{Extractibles (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \qquad \text{(II.1)}$$

où M_1 est la masse de sciures de bois sec avant extraction et M_2 celle du résidu sec après extraction.

II.2.5 Dosage du taux de cendres

Les cendres représentent le résidu inorganique restant après que l'eau et la matière organique ont été éliminées par combustion, ce qui fournit une mesure de la quantité totale de minéraux dans la biomasse. La détermination du taux de cendres a été conduite selon le protocole de Sluiter (2008). Ainsi, des échantillons secs de sciure libre d'extractibles de 2 g sont pesés dans

des creusets en porcelaine pré-pesés. Les creusets sont ensuite placés dans un four à moufle à 575 ± 25 °C pendant au moins cinq heures. L'eau et les autres matières volatiles sont vaporisées et les substances organiques sont brûlées en présence d'oxygène dans l'air en CO_2, H_2O et N_2. Ensuite, les creusets sont retirés du four et placés dans un dessiccateur où ils sont laissés refroidir pendant 1 heure, avant d'être pesés. Le taux de cendres est déterminé à partir de l'expression suivante :

$$\textbf{Taux de cendre (\%)} = \frac{M_3 - M_1}{M_2} \times 100 \tag{II.2}$$

M_3 est la masse du creuset après combustion, M_1 la masse du creuset vide et M_2 la masse initiale d'échantillon.

II.2.6 Séparation de l'holocellulose par délignification

L'holocellulose représente la fraction polysaccharidique totale du bois qui est constituée de cellulose et des hémicelluloses. Elle est obtenue en retirant les substances extractibles et la lignine du matériau naturel d'origine. La méthode de dosage de l'holocellulose consiste à préparer 1 g d'échantillon après extraction soxhlet auquel sont ajoutés 32 mL d'eau distillée, 0,2 mL d'acide acétique et 0,4 g de chlorite de sodium dans une bouteille ou un Erlenmeyer. Le mélange est ensuite chauffé dans un bain-marie à 70 °C. Après 60 minutes, on ajoute à nouveau 0,2 mL d'acide acétique et 0,4 g de chlorite de sodium. Après chaque heure, des ajouts de 0,2 mL d'acide acétique et de 0,4 g de chlorite de sodium frais sont réalisés et le mélange est agité au moyen d'une baguette en verre pendant 15 s (Figure II.5). Toutefois, le processus de délignification dégrade certains des polysaccharides et l'application d'un excès de chlorure doit être évitée. En effet, une réaction prolongée éliminera plus de lignine, mais l'hémicellulose sera également perdue (Rowell; 1980). L'ajout de 0,2 mL d'acide acétique et de 0,4 g de chlorite de sodium est répété jusqu'à ce que l'holocellulose soit complètement séparée de la lignine, ce qui peut être détecté par un changement de coloration des sciures de bois en un aspect blanchâtre.

Au bout de 6 à 8 heures de chlorage, la quasi-totalité de la lignine est en général éliminée. Le tube est alors retiré du bain-marie et laissé à refroidir à l'air libre. Une fois le tube à température ambiante, le mélange est filtré sous vide à l'aide d'un creuset filtrant (porosité 3) préalablement séché et pesé. Le résidu de filtration est lavé d'abord à l'eau milli–Q jusqu'à décoloration complète, puis à l'acétone à 4 °C jusqu'à ce que la couleur jaune (l'holocellulose est blanche) et l'odeur du dioxyde de chlore aient été éliminées. Enfin, le creuset contenant le résidu est séché à l'étuve à 110 °C pendant 12 heures ; ensuite, il est mis au dessiccateur pendant une heure, puis pesé. En fin de dosage, l'holocellulose ne doit plus contenir de lignine ; par conséquent, la teneur en holocellulose est obtenue par l'équation suivante :

$$\textbf{Holocellulose (\%)} = \frac{M_2}{M_1} \times 100 \tag{II.3}$$

où M_1 (masse initiale) et M_2 (résidu sec) sont respectivement les masses de l'échantillon avant

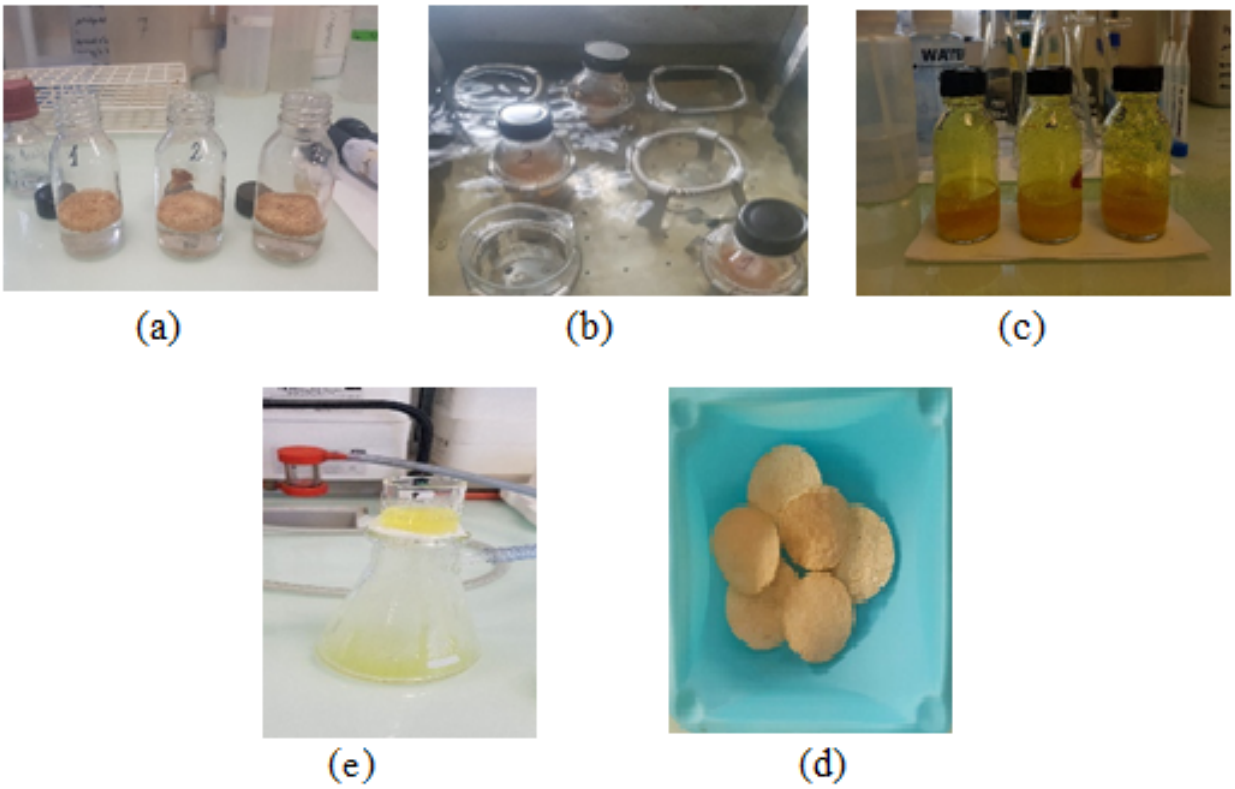


FIGURE II.5: Etapes de dosage de l'holocellulose : a. Hydrolyse au chlorite de sodium, b. Chauffage, c. Rajout de chlorite de sodium et acide acétique, d. Filtration, e. Holocellulose après séchage.

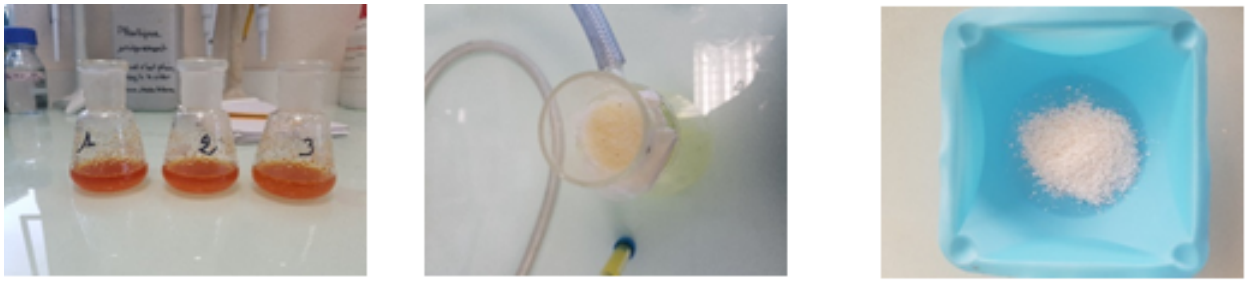
et après délignification.

II.2.7 Dosage de l'α-cellulose

La quantité d'α-cellulose est déterminée par hydrolyse alcaline (Figure II.6) de la fraction hémicellulosique de l'holocellulose, généralement par la soude (NaOH). Ce protocole implique les étapes suivantes. Tout d'abord, 1 g d'holocellulose sec préparé selon la méthode de la section précédente est mis en solution dans 25 mL de soude à 17,5 % (4,3 M) dans un Erlenmeyer de 200 mL, recouvert de parafilm et placé sous agitation. Après 45 min, 5 mL d'eau distillée sont ajoutés. Après mélange du contenu pendant 1 min, celui-ci est laissé au repos à température ambiante pendant 1 heure avant de filtrer sous vide sur un creuset filtrant de porosité 3 en s'assurant que toutes les particules ont été transférées de l'Erlen au creuset. Le résidu est ensuite lavé avec 100 mL d'une solution à 8,3 % (p/p) de NaOH à 20 °C, puis avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. Une fois le vide cassé, le creuset est rempli d'environ 2 cm d'acide acétique à 10 % à température ambiante. Après 3 minutes d'attente, l'acide est aspiré sous vide. Le creuset et son contenu sont séchés à l'étuve pendant une nuit à 110 °C. Après une période de refroidissement de 1 heure dans un dessiccateur, l'échantillon est pesé et la teneur d'α-cellulose est obtenue par :

$$\textbf{α-cellulose (\%)} = \frac{M_2}{M_1} \times 100 \tag{II.4}$$

où M_1 (masse initiale) et M_2 (résidu sec) sont respectivement les masses de l'échantillon avant et après hydrolyse alcaline.



(a) (b) (c)

FIGURE II.6: Étapes de dosage de l'α-cellulose : a. Hydrolyse alcaline, b. Filtration et lavage, c. α-cellulose après séchage.

II.2.8 Dosage de l'hémicellulose

Comme mentionné au paragraphe II.2.7, le traitement de l'holocellulose par la soude permet d'éliminer la fraction hémicellulosique, ce qui donne accès au dosage de l'α-cellulose. La fraction hémicellulosique de l'holocellulosique étant hydrolysée, la détermination de la teneur en hémicellulose est obtenue par la relation :

$$\textbf{Hémicellulose} \quad (\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \tag{II.5}$$

où M_1 (masse initiale) et M_2 (résidu sec) sont respectivement les masses de l'échantillon avant et après hydrolyse alcaline.

II.2.9 Dosage de la lignine de Klason ou lignine insoluble

Le dosage de la lignine est réalisé selon le protocole TAPPI Standard T204 cm-97, 1997 (Figure II.7). Dans ce dernier, 200 mg de sciure sèche libre d'extractibles sont introduits dans un tube à vis et traités par 2 mL d'acide sulfurique à 72 % pendant 2 heures dans un bain marie à 30 °C. Après l'ajout de l'acide sulfurique, une suspension gélatineuse se forme après un temps de contact de 30 secondes, ce qui exige de mettre le tube au vortex toutes les 15 min afin d'améliorer le contact entre l'acide et la matière. Après 2 h de traitement, la concentration en acide sulfurique est réduite à 4 % par addition d'eau milli-Q. Ensuite, le tube est mis à l'autoclave pendant une heure à 121 °C. Cette étape permet de rompre les membranes de certaines cellules végétales qui n'avaient pas pu l'être lors de la première hydrolyse.
Le tube est retiré de l'autoclave et une filtration à chaud sur fritté poreux (N°3) est effectuée afin d'éliminer les traces d'acide et les sucres hydrolysés. Pour ce faire, le résidu est lavé avec de l'eau déminéralisée jusqu'à ce que le pH devienne légèrement acide. Le résidu obtenu, appelé lignine insoluble ou encore lignine de Klason, est séché à l'étuve pendant 12 heures à 110 °C,

puis mis dans un dessiccateur pendant une heure et enfin pesé.
La relation ci-dessous permet de déterminer la fraction insoluble de la lignine (LK) qui peut ensuite être analysée par différentes méthodes spectroscopiques :

$$\textbf{LK (\%)} = \frac{M_2}{M_1} \times 100 \tag{II.6}$$

où M_2 est la masse sèche correspondant à la fraction de lignine insoluble, et M_1 est la masse de sciure sèche.

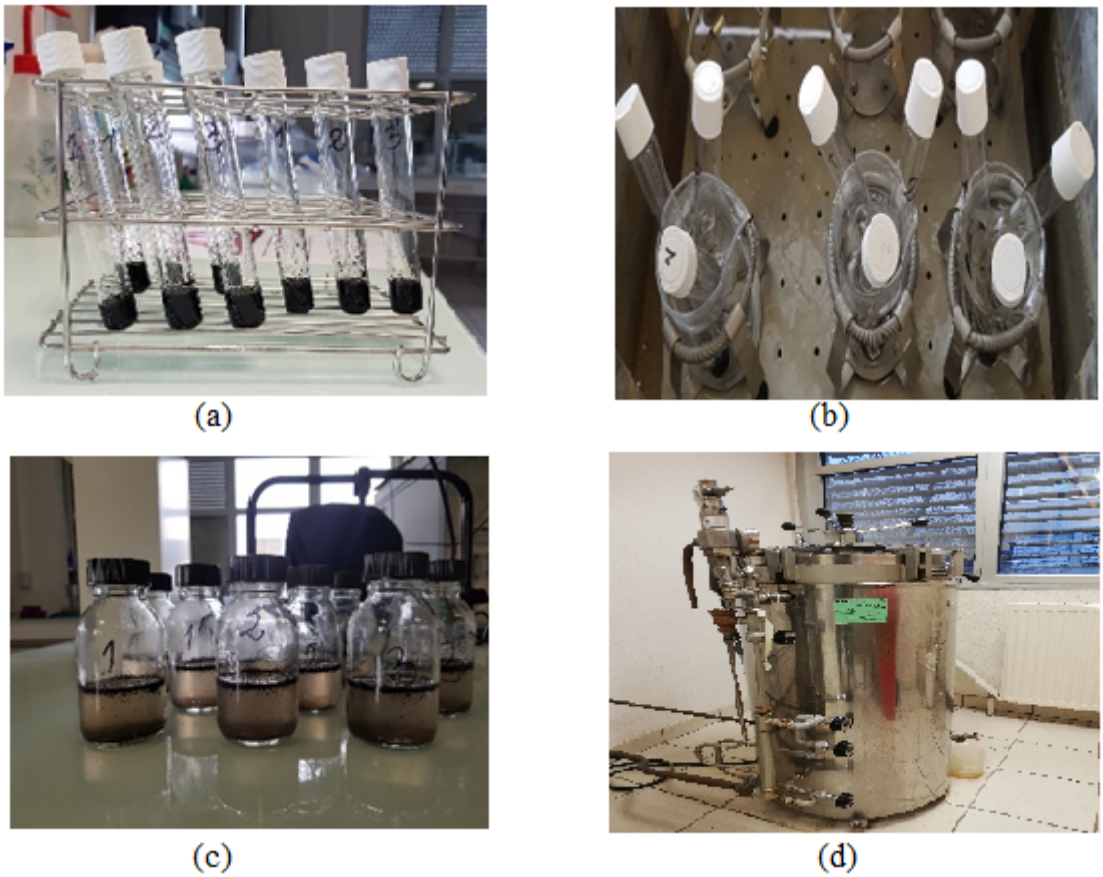


FIGURE II.7: Étapes impliquées dans le dosage de la lignine de Klason : a. Mise en contact du substrat avec l'acide H_2SO_4 à 72%, b. Chauffage à 30 °C, c. Dilution à 4%, et d. Mise à l'autoclave.

II.2.10 Dosage de la lignine soluble dans l'acide LSA

Le traitement du bois à l'acide sulfurique décrit au paragraphe II.2.9 ne solubilise pas que la cellulose et les hémicelluloses. Lors de ce processus, une partie de la lignine est également dégradée et dissoute dans le milieu acide. Pour déterminer la teneur en lignine solubilisée, le filtrat récupéré avant lavage à l'eau milli-Q est analysé au spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde de 205 nm, longueur d'onde d'absorption de la lignine résultant de la présence d'aromatiques. Ainsi, la teneur en lignine soluble peut être estimée à partir de l'expression ci-dessous :

$$\mathbf{L.S.A} = \frac{Abs.D.V}{l.a.M} \tag{II.7}$$

où D le facteur de dilution, V le volume du filtrat (en litres), Abs l'absorbance du filtrat, M la masse de matière hydrolysée (g), a l'absorptivité du bois (110 L/g.cm) et 1 l'épaisseur de la cuve (1 cm).

II.3 Prétraitement Organosolv

II.3.1 Réacteur de prétraitement : Monowave 450

Les expériences de prétraitement Organosolv se passent dans des conditions thermiques qui dépassent les 100 °C. Afin de réaliser de telles expériences, le réacteur à micro-ondes, Monowave 450 (Anton Paar, France) équipé d'un passeur automatique MAS240 a été utilisé (Figure II.8).

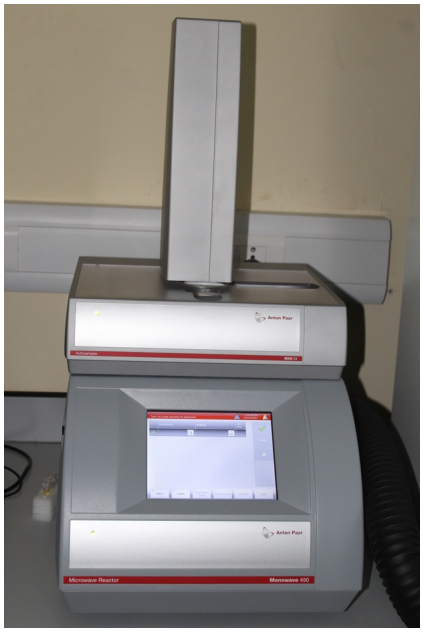


FIGURE II.8: Réacteur micro-ondes utilisé pour le prétraitement Organosolv (Monowave 450, Anton Paar, Autriche)

Le réacteur Monowave est un extracteur automatisé équipé d'un magnétron délivrant un rayonnement micro-ondes puissant et non-pulsé d'au maximum 850 W qui permet d'obtenir des conditions de réaction pouvant atteindre 300 °C sous une pression de 30 bars dans des tubes de 30 mL (20 mL de volume utile). Il fournit ainsi un chauffage rapide, efficace et uniforme pour tout type de solvant. Le passeur automatique d'échantillons (MAS24) permet de traiter consécutivement 24 tubes fermés en verre borosilicaté avec des capuchons clipsables en PEEK. La température et la pression des tubes peuvent être suivies en continu. Pour un contrôle plus précis de la température que le thermomètre infrarouge, un thermomètre à sonde rubis placé dans un tube réactionnel peut être utilisé. Le réacteur Monowave est également équipé d'un agitateur magnétique intégré qui fournit des vitesses d'agitation comprises entre 0 et 1200 trs/min au

moyen de barreaux d'agitation appropriés pour les tubes de façon à assurer une homogénéité de température. Le Monowave 450 est équipé d'une interface tactile qui permet la programmation et le suivi des essais ; il est conçu de telle sorte qu'il est possible de définir la température et la durée de prétraitement de chaque tube. La durée totale peut être divisée en trois phases que l'appareil permet de définir : un temps de montée en température, un temps de maintien à la température de consigne et un temps de refroidissement (Figure II.9). En effet, pour des raisons de sécurité, les tubes réactionnels sont ouverts uniquement après refroidissement à la température indiquée (55 °C dans notre cas). Le Monowave 450 est donc particulièrement adapté à des études de screening puisqu'il peut traiter jusqu'à 24 échantillons différents, mais il peut également être utilisé en mode semi-préparatif en programmant 24 échantillons identiques.

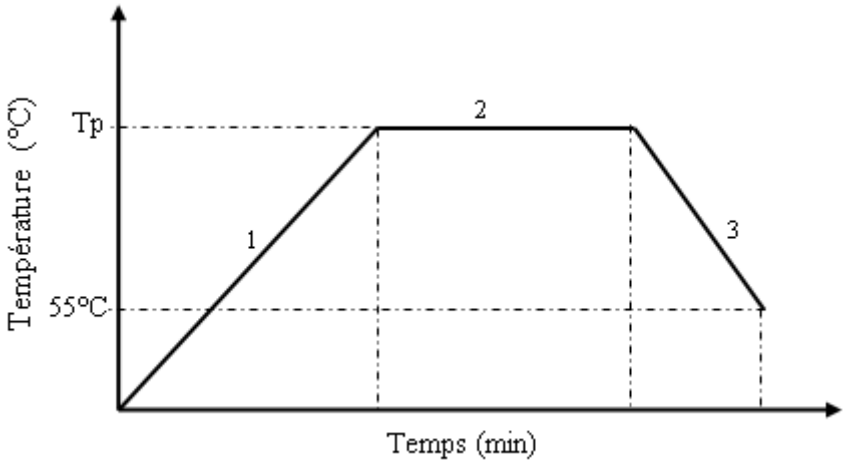


FIGURE II.9: Différentes étapes du prétraitement par micro-ondes, (1) : phase de montée en température, (2) : phase de maintien en température, (3) : phase de refroidissement.

II.3.2 Mise en œuvre du prétraitement Organosolv

Comme mentionné dans le chapitre précédent, le prétraitement Organosolv est un procédé de délignification qui permet d'extraire la lignine ainsi que les hémicelluloses de la BLC dans des conditions de température et de pression élevées. Il permet donc, en utilisant des phases liquides organiques ou aqueuses/organiques, de récupérer les hémicelluloses en phases aqueuses, la lignine précipitée sous forme solide et la cellulose qui reste intacte dans le résidu solide (Duff and Murray; 1996).

Les principaux paramètres de fonctionnement et leurs plages respectives ont été définis à partir de l'état de l'art sur le prétraitement Organosolv, puis évalués à partir d'essais préliminaires qui ne sont pas détaillés dans cette thèse. Les conditions retenues dans la suite de ce travail sont les suivantes : le mélange de sciure sec de granulométrie 0,5 à 1 mm a été mis en suspension dans un mélange éthanol-eau comme solvant avec un rapport solide/liquide fixe (S/L = 1 g de sciure de bois sèche/15 mL de solvant) ; la durée de traitement, fixée à 60 min au début des essais a ensuite été modulée entre 10 et 60 min par pas de 10 min ; une concentration variable d'acide sulfurique (H_2SO_4) (0, 0,25, 0,5, 0,7, 1 % v/v) a été utilisée comme catalyseur ; plusieurs

rapports éthanol-eau (40/60, 50/50, 60/40, 70/30,80/20 v/v) et conditions de température (175 et 190 °C) inspirées de la littérature ont été appliqués.
Un programme de commande de température approprié a été défini ; il inclut la rampe de température de chauffe, la durée de traitement à la température de consigne et la durée de refroidissement. Pour toutes les expériences, le réacteur a été chauffé à la température appropriée pendant un temps de traitement défini, avec un temps de montée en température de 15 min pour atteindre la consigne. Un avantage clé du chauffage assisté par micro-ondes est d'obtenir une rampe de température rapide : par exemple, Park et al. (2010), lors du traitement du pin Pitch (éthanol à 50% v/v, 1% p/p H_2SO_4 pour une plage de températures de 150 à 210 °C) ont appliqué une durée de traitement inférieur à 20 min, ce qui peut sembler court par rapport à ce travail, mais après une rampe de chauffe de 50 minutes pour atteindre la température de traitement ; cela met en évidence que la durée d'un de leurs cycles de traitement était très proche de celle du présent travail.

II.4 Post-traitements à la cuisson Organosolv

Comme le montre la Figure II.10, à la fin de chaque essai de prétraitement (ou cuisson) Organosolv, la suspension du substrat (sciure de bois) dans le solvant est filtrée sous vide modéré. A l'issue de cette filtration deux phases sont obtenues, une phase solide appelée "**pâte**" et une phase liquide appelée "**liqueur noire**".
La pâte, appelée fraction insoluble ou résidu solide récupérée après la cuisson Organoslv (Figure II.11) représente généralement toute la cellulose de la matière première d'origine, plus une fraction des hémicelluloses et une quantité de lignine résiduelle, la teneur de ces impuretés dépendant de l'intensité des conditions de cuisson. Cette fraction est soumise à une hydrolyse

FIGURE II.10: Étape de séparation solide/liquide (pâte/liqueur noire)

enzymatique et à une fermentation pour produire de l'éthanol. La pâte prétraitée est lavée avec un mélange éthanol/eau à 60 °C (3 x 50 mL) de la même concentration que celui utilisé pour le prétraitement. Cette même pâte est ensuite lavée 3 fois avec de l'eau ultrapure à 60 °C. Le solvant de lavage éthanol/eau est conservé ; en revanche, les eaux de lavage sot éliminées. Enfin, le résidu est séché à l'étuve à 110 °C pendant 12 heures pour analyse.
En ce qui concerne la liqueur noire, il s'agit de la solution aqueuse à forte teneur en lignine et en hémicelluloses dissoutes lors du prétraitement ; celle-ci contient aussi les autres composés inorganiques utilisés dans le processus de dissolution, les résidus résultant de la décomposition chimique de la matière lignocellulosique, ainsi que les inhibiteurs de fermentation solubles.
La liqueur noire et le solvant de lavage (éthanol/eau) sont combinés. La liqueur résultante est stockée au réfrigérateur pour dosage des saccharides monomères et oligomères, de la lignine dépolymérisée, des composés dérivés de saccharides, en particulier les inhibiteurs de fermentation, ainsi que pour la récupération de la lignine Organosolv par précipitation.

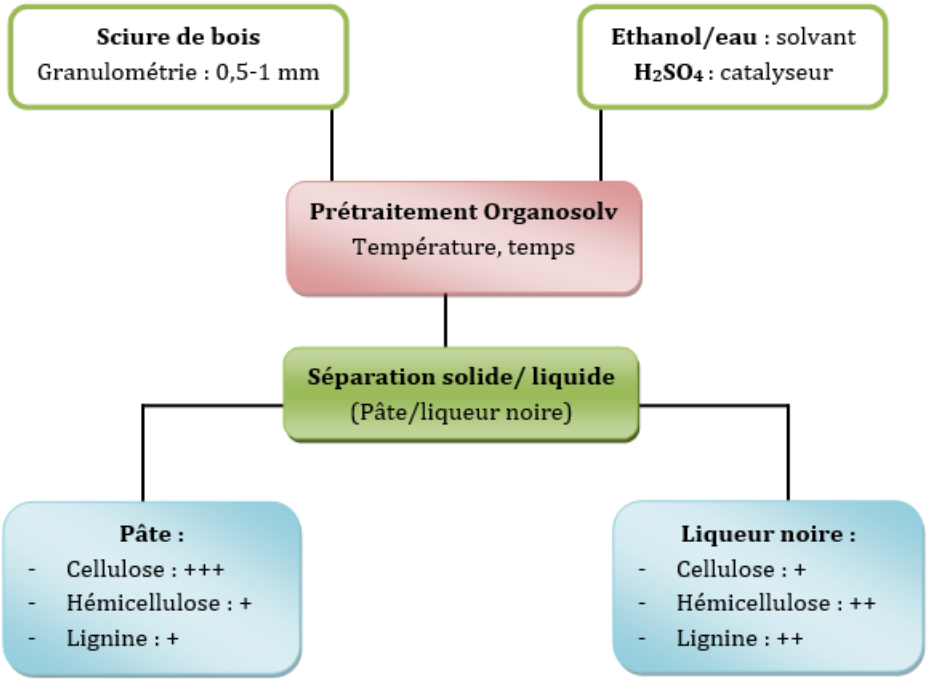


FIGURE II.11: Schéma des étapes après prétraitement Organosolv avec : +++ : Teneur élevée, ++ : Teneur moyenne et + : Teneur faible

II.4.1 Dosages chimiques sur le résidu solide (pâte)

Il faut tout d'abord préciser que pour produire de l'éthanol à partir de notre sciure de bois, nous nous intéresserons en priorité à la quantité de polysaccharides contenus dans la sciure prétraitée (pâte), notamment à la fraction cellulosique.
Pour connaître la composition de la pâte (fractions lignine, hémicellulose et cellulose), cette dernière est soumise à l'ensemble des dosages énumérés dans la section II.2.
Ainsi, la performance du prétraitement Organosolv a été évaluée en estimant le rendement de

récupération de la cellulose et la pureté de la cellulose dans la fraction solide restante, définis comme suit.

$$\textbf{Rendement de cellulose (\% p/p)} = \frac{Qtité\ de\ cellulose\ dans\ le\ résidu\ solide}{Qtité\ de\ cellulose\ initiale\ dans\ le\ mélange} \times 100 \tag{II.8}$$

$$\textbf{Pureté de cellulose (\% p/p)} = \frac{Qtité\ de\ cellulose\ dans\ le\ résidu\ solide}{Quantité\ de\ résidu\ solide} \times 100 \tag{II.9}$$

II.4.2 Dosage des produits de dégradation : inhibiteurs

Pour déterminer les concentrations des composés issus de la dégradation des pentoses et hexoses lors du prétraitement, la liqueur noire a été échantillonnée pour leur identification et quantification par des méthodes chromotographiques. Ainsi le furfural et le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (5-HMF) ont été dosés à l'aide d'un système HPLC Agilent (série 1100) équipé d'une colonne Luna®C18 (Phenomenex, USA) fonctionnant à 80 °C et un détecteur UV utilisé à 280 nm. De l'eau distillée, du méthanol et de l'acide acétique (80/10/3 v/v/v) sont utilisés comme éluant à un débit de 0,5 mL/min. Des aliquotes diluées de manière appropriée (20 μL) sont injectées après filtration à 0,45 μm sur filtre seringue. Des solutions de furfural et 5-HMF à 40 mg/L ont été préparées pour l'élaboration des gammes étalons de chacun de ces composés. Les deux solutions ont ensuite été mélangées volume à volume pour obtenir une concentration de furfural et 5-HMF à 20 mg/mL.
D'autres composés de dégradation, l'acide acétique, l'acide lévulinique et l'acide formique, ont également été dosés au moyen de la chaîne d'analyse HPLC décrite dans la section II.5.5.1.

II.4.3 Précipitation de la lignine Organosolv

La liqueur noire contient une grande fraction de lignine dissoute lors du prétraitement. celle-ci est récupérée par précipitation par ajout d'un volume d'eau acidifiée (3/1 v/v à pH 2). Ce rajout provoque ainsi une dilution immédiate de la liqueur et l'incorporation de petites bulles d'air donnant une flottabilité aux particules de lignine formées. Le mélange résultant est laissé à température ambiante pendant au moins 30 minutes jusqu'à ce que toutes les particules de lignine flottent en surface de la solution. Après sédimentation des particules par centrifugation, le surnageant est décanté et la lignine est récupérée, séchée à l'étuve à (60 °C) puis pesée.

Le rendement de récupération de la lignine est exprimé comme suit :

$$\textbf{Rendement de lignine (\% p/p)} = \frac{Quantité\ de\ lignine\ précipitée}{Quantité\ de\ lignine\ totale\ dans\ le\ substrat\ de\ sciures} \times 100 \tag{II.10}$$

FIGURE II.12: Processus de précipitation de la lignine Organosolv.

II.5 Hydrolyse enzymatique

II.5.1 Substrats

Le substrat utilisé pour l'étape d'hydrolyse enzymatique est la phase solide (pâte) obtenue à l'issue du prétraitement Organosolv dans nos meilleures conditions d'étude. Les conditions optimales obtenues expérimentalement sur la sciure sont les suivantes : un rapport éthanol/eau de 60/40 avec 0,25 % H_2SO_4 pour une extraction d'une heure à 175 °C. Ces conditions ont permis d'éliminer 50 % de la lignine tout en conservant 82 ± 3% de la cellulose initiale avec une pureté de 71 ± 3%. La composition du mélange de sciure de bois prétraité était alors : 70,6 % de cellulose, 9,8 % d'hémicellulose et 19,6% de lignine, comme déterminé par hydrolyse acide grâce à un acide fort (Alio et al.; 2019). La présence des fractions de lignine et d'hémicellulose dans le mélange de sciure prétraité permet d'évaluer la complexité du substrat à traiter. Ainsi, le solide obtenu se caractérise par une distribution de taille comprise entre 0,5 et 1 mm et une humidité spécifique dépendante du temps de filtration après prétraitement.

II.5.2 Tampon

Les réactions enzymatiques nécessitent des milieux réactionnels à pH contrôlé. En l'occurrence, l'ensemble des expériences d'hydrolyse enzymatique ont été réalisées en présence de solution tampon d'acétate de sodium à 50 mM et à pH 4,8.

II.5.3 Cocktail enzymatique

Un cocktail cellulolytique commercial liquide, le Cellic®Ctec2 (Sigma-Aldrich, ref. C2730) est utilisé pour ces expériences. Ce cocktail liquide est produit par le champignon *Trichoderma reesei* et contient les trois activités cellulolytiques EG, CBH et BGL. L'activité en cellulase n'ayant pas été donnée par le fournisseur, elle a donc été déterminée avant nos essais d'hydrolyse enzymatique selon la méthode de Ghose (1987). En l'occurrence, seule la charge d'activité de cellulase a été déterminée.

II.5.3.1 Mesure de l'activité cellulase

La mesure de l'activité du cocktail d'enzyme Cellic®Ctec 2 a été réalisée en suivant la méthode de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) développée par Ghose (1987). Une incubation de 1 mL de tampon d'acétate de sodium à 50 mM à pH 4,8, avec 0,5 mL d'enzyme et un papier filtre Whatman N°1 de 50 mg (1x6 cm) a été réalisée dans un tube à essai à 50 °C pendant 60 min. Les sucres solubles réducteurs (glucose) produits au cours de l'hydrolyse ont été quantifiés par dosage colorimétrique au DNS (Acide 3,5 Dinitrosalycilique) selon la méthode de Miller (1959) décrite à la section II.5.5.2. Deux témoins ont été préparés : un premier sans substrat qui contient 1 mL de tampon et 0,5 mL d'enzyme, et un second sans enzyme qui contient 1,5 mL de tampon et le papier filtre. Une gamme étalon de glucose a été établie pour calculer l'activité cellulase. L'unité FPU (Filtre Paper Unit) est définie comme 1 μmol de glucose libéré par minute. La quantité absolue de glucose libéré dans l'essai de FPU à la dilution critique est 2,0 mg qui correspond à 0,37 UI mL^{-1}.

II.5.3.2 Dosage des protéines

Pour la détermination de la teneur en protéines du cocktail enzymatique, un dosage selon la méthode de Bradford (1976) a été appliqué. C'est un dosage colorimétrique basé sur le changement de couleur du bleu de Coomassie lorsqu'il se complexe avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés hydrophobes présents dans les protéines. L'absorbance de ce complexe est mesurée à 595 nm avec le spectrophotomètre UV-Visible (CPS-240 A, Shimadzu). L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon. Une gamme étalon comprise entre 0 et 1,5 mg/mL est réalisée avec une solution mère d'albumine bovine à 2 mg/mL. Les acides animés, les peptides et les protéines de faible masse moléculaire (<3000 Da) ne sont pas détectés par cette méthode.

II.5.4 Conditions opératoires de conduite d'hydrolyse

Tous les essais d'hydrolyse enzymatique ont été effectués selon la procédure standard NREL (Selig; 2008) sur le mélange de sciure de bois prétraité obtenu par les meilleurs conditions de prétraitement. Le substrat solide du mélange de sciure prétraité a été séché au four (110 °C pendant 12 h) ou non.

L'hydrolyse enzymatique du mélange prétraité a été réalisée dans des bouteilles Schott, dans des conditions discontinues, à 50 °C dans un bain-marie agitant (Julabo SW22, France) muni d'une double enveloppe et d'un couvercle pour minimiser l'évaporation (Figure II.13). Pour s'affranchir de l'effet des conditions opératoires, celles-ci restent fixes autour de leurs valeurs optimales pour l'ensemble des expériences. La vitesse d'agitation est fixée à 180 trs/min. La température est régulée autour de 50 °C à l'aide d'un thermostat. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée dans une solution tampon d'acétate 50 mM à pH 4,8 en utilisant le cocktail d'enzyme mentionné ci-dessus et l'antibiotique streptomycine pour éviter une contamination. Différentes

concentrations de charge de substrat prétraité ont été testées : 15 g/L (1,5 %), 37 g/L (3,75 %), 45 g/L (4,5 %) et 52 g/L (5,2 %).

La libération des glucides pendant l'hydrolyse a été déterminée par HPLC et par dosage DNS comme décrit dans les sections II.5.5.1 et II.5.5.2. Le rendement d'hydrolyse enzymatique a été calculé avec l'équation suivante :

$$\textbf{Conversion cellulose-glucose (\%)} = \frac{C_{glucose}\ \left(\frac{g}{L}\right)\ \times V_{liquide}\ \times 0.9}{M_{solide}\ (g)\ \times x_{cellulose}} \times 100 \qquad \text{(II.11)}$$

où M_{solide} représente la masse de substrat utilisé, $x_{cellulose}$ la fraction de cellulose dans le substrat, $C_{glucose}$ et $V_{liquide}$ représentent respectivement la concentration en glucose dans l'hydrolysat et le volume du milieu.

FIGURE II.13: Photographie du bain marie utilisé pour l'hydrolyse enzymatique

Pour le suivi de la réaction d'hydrolyse, des prélèvements séquentiels ont été effectués afin de réaliser les différentes analyses physiques et biochimiques décrites ultérieurement. Pour bloquer l'action des enzymes, les prélèvements destinés aux différentes analyses sont plongés dans de l'eau bouillante (T > 90 °C) pendant 10 mn et centrifugés à 10 000 g pendant 5 min pour séparer les phases liquide et solide avant les différents dosages.

II.5.5 Suivi d'hydrolyse

Afin de suivre l'évolution des concentrations du substrat carboné et des carbohydrates, deux méthodes ont été utilisées : une méthode par HPLC et une méthode de dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.

II.5.5.1 Dosage des sucres et composés acides par HPLC

Pour déterminer les concentrations en sucres, une chaine HPLC (High Performance Liquid Chromotography) a été utilisée. Des échantillons de 2 ml ont été prélevés dans la phase liquide chaque 2 heures pendant 12h puis chaque 24h jusqu'à l'arrêt de l'expérience.

La chaîne HPLC utilisée (1260 Infinity Quaternary LC System, Agilent Tehnology, Etats-Unis) est constituée de deux colonnes mixtes montées en série qui combinent échange d'ions et exclusion stérique (Rezex ROA 300X 7,8 mm, Phenomenex, États unis). La phase mobile est une solution à 2 mM d'acide sulfurique dans de l'eau ultrapure (MilliQ Plus. Millipore, France), dégazée en continu. Le débit de la phase mobile est fixé à 0,70 mL/min à l'aide d'une pompe (HP 1100 series. Agilent Technologies, États- Unis). Cette chaîne est équipée d'un injecteur automatique à boucle fixe (Rheodyne Valve, Agilent technology, États–Unis) qui permet d'injecter 10 μL d'échantillon. La détection des composés est assurée par un réfractomètre (HP 1100 series, Agilent technologies, Etats-Unis). L'acquisition et l'intégration des mesures sont réalisées par l'intermédiaire du logiciel Chemstation®(HPChem, Agilent Technologies, États-Unis).

Avant d'être analysés et afin d'éviter l'encrassement des colonnes, les échantillons doivent être déprotéinisés. A cet effet, 250 μL d'une solution d'hydroxyde de baryum ($Ba(OH)_2$; 0,3 M) et 250 μL d'une solution de sulfate de zinc $ZnSO_4$. $7H_2O$; 5% p\v) sont ajoutés à 2 mL d'échantillon. La présence de ces composées entraîne la précipitation des protéines de l'échantillon. Après 5 min de centrifugation à 10 000 g, le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose (Chromafil, Allemagne) de 0,2 μm et placé dans des vials pour analyse.

II.5.5.2 Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS

Les extrémités réductrices des sucres sont des fonctions aldéhydes qui peuvent être oxydées en fonctions carboxyliques en présence d'un oxydant tel que l'acide dinitrosalicylique (DNS) en milieu chaud et alcalin. Le DNS initialement de couleur jaune vire en orangé-rouge après réaction, dosable par spectrophotométrie (Miller; 1959). Nous utilisons des solutions étalons de glucose avec une gamme de concentrations de [0-1] g/L préparées à partir de la solution tampon acétate pour avoir le même pH que les échantillons. Les échantillons sont mélangés avec le réactif DNS à 50/50 en volume. La réaction se fait dans un bain marie à 100 °C pendant 5 mn. Les échantillons sont mis directement dans de l'eau glacée pour bloquer la réaction, puis les analyses spectrométriques sont conduites à 540 nm.

II.6 Fermentation alcoolique : production de bioéthanol

II.6.1 Souche de *Saccharomyces cerevisiae*

La souche *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 utilisée couramment en panification fournie sous forme de lyophilisat est utilisée dans cette thèse. Elle est reprise dans de l'eau stérile, puis dans le milieu MY (en g/L) : glucose, 20 ; extrait de levure, 3 ; polypeptone, 5 ; extrait de malt, 3 ; gélose, 20. Les cultures sont maintenues à 30 °C pendant 24 heures, puis conservées à 4 °C. La souche est repiquée sur boîte de Petri au besoin 24 heures avant d'être utilisée en milieu liquide.

II.6.2 Milieux de culture

Pour les expérimentations de fermentation, deux milieux de culture ont été testés :

— Premièrement, l'hydrolysat issu de l'hydrolyse enzymatique est considéré comme témoin permettant de tester la capacité des levures à se développer et à produire de l'éthanol ; celui-ci sera appelé **hydrolysat non enrichi : UE.H (UnEnriched Hydrolysate)**.

— Deuxièmement, l'hydrolysat est enrichi et complété par des éléments du milieu défini par Kristiansen (1994), pour une comparaison avec le milieu non enrichi. Celui-là sera appelé **hydrolysat enrichi : E.H (Enriched Hydrolysate)**

Les deux milieux de culture sont préparés et autoclavés à 121 °C et 1 bar pendant 20 minutes.

II.6.3 Matériel de culture et conditions

Deux types d'expériences ont été conduites : en Erlenmeyer et en bioréacteur.

a. En Erlenmeyer

A titre d'essais préliminaires, la production d'éthanol a été réalisée dans des Erlenmeyers de volume 150 mL. Les expérimentations sont conduites en batch avec un volume utile de 50 mL. Les Erlenmeyers sont placés dans un incubateur à 30 °C sous agitation à 200 trs/min. Avant le démarrage de la culture, le pH a été ajusté à 5.

b. En réacteur

Dans un second temps, un bioréacteur de volume 500 mL (Infors HT, Multifors 2) a été utilisé (Figure II.14). Dans ce cas, les expérimentations sont également conduites en batch avec un volume utile de 0,45 L, qui inclut 0,4 L de milieu de culture et 0,05 L d'inoculum ajoutés en début d'expérimentation.

Le bioréacteur est équipé de sondes de pH et de température reliées à une Unité de Contrôle Digital DCU permettant de fixer les différents points de consignes. Le pH est régulé à une valeur de consigne de 5 par ajout d'une solution d'hydroxyde de potassium 5 N tout au long de la fermentation. La vitesse d'agitation est fixée à 200 trs/min sans aération. Finalement, la température est maintenue à 30 °C par un système chauffant à double enveloppe.

Comme mentionné ci-dessus, 50 mL d'inoculum sont préparés pour l'inoculation du bioréacteur. Pour cela, par deux fois, 3% de la levure *S. cerevisiae* sont repiqués dans des bouteilles contenant le milieu de préculture, et cultivés en anaérobiose pendant 12 heures dans un incubateur (INFORS HT, Multitron Standard). L'incubation a lieu sous une vitesse d'agitation réglée à 180 trs/min.

II.6.4 Suivi de fermentation

Afin de suivre l'avancement de la fermentation, des échantillons sont prélevés toutes les heures durant 8 heures, le dernier étant réalisé après 24 heures. Une partie de l'échantillon prélevé subit une dilution suffisante pour mesurer sa densité optique à 540 nm à l'aide du spectrophotomètre

FIGURE II.14: Photographie du bioréacteur utilisé pour la production d'éthanol

UV-visble évoqué dans la section II.5.5.2. Une autre partie des échantillons est filtrée sur des filtres de 0,2 μm pour la détermination du poids sec. Enfin, les filtrats sont centrifugés. Les surnageants sont récupérés pour le dosage des concentrations d'éthanol, de glucose résiduel et des inhibiteurs formés lors du prétraitement selon les protocoles détaillés dans les sections II.5.5.1 et II.5.5.2.

Bibliographie

Alio, M. A., Tugui, O.-C., Vial, C. and Pons, A. (2019). Microwave-assisted Organosolv pretreatment of a sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery, *Bioresource Technology* **276** : 170–176.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**(1) : 248–254.

Duff, S. J. B. and Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol : A review, *Bioresource Technology* **55**(1) : 1–33.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities, *Pure and Applied Chemistry* **59**(2) : 257–268.

Kristiansen, B. B. (1994). *Integrated design of a fermentation plant : the production of baker's yeast*, Weinheim ; New York : VCH.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry* **31**(3) : 426–428.

Park, N., Kim, H.-Y., Koo, B.-W., Yeo, H. and Choi, I.-G. (2010). Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (Pinus rigida), *Bioresource Technology* **101**(18) : 7046–7053.

Rowell, R. M. (1980). Distribution of reacted chemicals in southern pine modified with methyl isocyanate., *Wood Science* **13**(2) : 102–110.

Selig, M. (2008). *Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass laboratory analytical procedure (LAP) : issue date, 3/21/2008 /*, National Renewable Energy Laboratory,, Golden, Colo. :.

Sluiter, A. (2008). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples : Laboratory Analytical Procedure (LAP) ; Issue Date : 12/08/2006, *Technical Report* p. 14.

Bilan

En accord avec les matériels et méthodes présentés, nous disposons à présent de tous les outils nécessaires pour étudier l'effet des conditions et paramètres opératoires des différentes étapes du procédé de production de bioéthanol de deuxième génération. Ainsi, l'ensemble des techniques d'analyses expérimentales décrites dans ce chapitre nous permettront de caractériser :

— l'efficacité de l'étape de prétraitement Organosolv qui se traduira par l'obtention d'un substrat prétraité riche en cellulose et purifié, c'est-à-dire contenant le moins possible de lignine résiduelle ;

— la cinétique et le rendement de conversion de la cellulose en glucose durant l'étape d'hydrolyse enzymatique par l'analyse des sucres réducteurs et des sucres simples (glucose) pour estimer l'avancement de la réaction d'hydrolyse enzymatique ;

— la cinétique et le rendement global de production d'éthanol lors de l'étape de fermentation alcoolique.

Chapitre III

Prétraitement Organosolv de la matière Lignocellulosique

« Si une idée ne paraît pas d'abord absurde, alors il n'y a aucun espoir qu'elle devienne quelque chose ! »

Albert Einstein

Sommaire

III.1 Introduction **99**

III.2 Materials and methods **101**

III.2.1 Materials : feedstocks and reagents 101

III.2.2 Feedstock chemical characterization 101

III.2.3 Organosolv pretreatment 102

III.3 Results and discussion **104**

III.3.1 Chemical composition of the sawmill mixed feedstocks 104

III.3.2 Effect of sulfuric acid and temperature on the Organosolv pretreatment 104

III.3.2.1 Effect on cellulose yield and purity 105

III.3.2.2 Effect on the Organosolv lignin recovery 108

III.3.2.3 Effect on inhibitor formation 110

III.3.3 Effect of ethanol-water ratio on the Organosolv pretreatment 110

III.3.3.1 Effect on cellulose yield and purity 110

III.3.3.2 Effect on the Organosolv lignin recovery 111

III.3.3.3 Effect on inhibitor formation 112

III.3.4 Comparison with conventional Organosolv pretreatment 112

III.4 Conclusion **114**

III.5 Acknowledgments **114**

III.6 Appendix A. Supplementary data **114**

Bibliographie **114**

Préambule

Le prétraitement Organosolv est un procédé de délignification très intéressant d'un point de vue de la valorisation de la matière organique et respectueux de l'environnement. Il utilise des phases liquides organiques ou aqueuses/organiques additionnées d'un catalyseur pour éliminer la lignine tout en favorisant la récupération de la cellulose et des hémicelluloses et en limitant la formation d'inhibiteurs de fermentation. La lignine, coproduit du fractionnement, peut être valorisée par ailleurs. Ce procédé a été initialement développé comme une alternative aux procédés classiques dans les industries de la pâte à papier. Il est prometteur dans le domaine de la bioraffinerie des matières premières lignocellulosiques car il donne accès à une utilisation optimale de leurs trois constituants essentiels (respectivement, la lignine, la cellulose et les hémicelluloses).

L'objectif principal de ce chapitre est d'étudier l'influence des paramètres opératoires d'un prétraitement Organosolv avec chauffage micro-onde. Des essais ont été réalisés sur le mélange de sciures de bois issues d'une scierie régionale en faisant varier les paramètres suivants : la concentration en acide sulfurique (H_2SO_4) en qualité de catalyseur, le rapport éthanol/eau dans le solvant d'extraction, la température et la pression de traitement, dans le but d'optimiser le fractionnement du bois. Le rendement et la pureté de la cellulose, la récupération de la lignine, la présence ou non d'inhibiteurs (provenant de la dégradation des sucres) et les pertes de matières, sont obtenus en réponses aux différents traitements appliqués.

Ce chapitre III a été publié dans la revue Bioresource Technology. De plus, les principaux résultats ont été présentés sous la forme d'une communication orale au cours de la conférence internationale BIORESTEC 2018 (2nd International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts et Environmental Sustainability BIORESTEC) qui s'est déroulée à Melia Sitges (Espagne) du 16 au 19 septembre 2018.

Microwave-assisted Organosolv pretreatment of a sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery

M. ABDOU ALIO[a], O.-C. TUGUI[b], Ch. VIAL[a, 1], A. PONS[a]

[a] Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut Pascal ; F-63000, Clermont Ferrand, France

[b] University "Vasile Alecsandri" of Bacău, Faculty of Engineering, Chemical and Food Engineering Department, Bacău, Romania

Abstract

A mixture of sawmill feedstocks comprising four softwood species (fir, spruce, Scots pine, and Douglas fir) was subjected to a microwave-assisted Organosolv pretreatment. The influence of H_2SO_4 as a catalyst, ethanol-water ratio as the solvent, and temperature on wood fractionation, cellulose yield and purity, lignin recovery, and inhibitor formation were investigated. Minute addition of H_2SO_4 (0.25% w/w) was found to enhance lignin extraction and hemicellulose hydrolysis, thus providing cellulose yield and purity above 68% ± 2% and 61% ± 3%, respectively. The increase in H_2SO_4 up to 1% and temperature up to 190 °C, impaired cellulose yields a result of intense hydrolysis, thus degrading cellulose and hemicellulose. Conversely, the increase in ethanol-water ratio enhanced delignification without cellulose degradation. Similarly, inhibitor formation increased with pretreatment severity (H_2SO_4 content and temperature), but was mitigated by higher ethanol-water ratio. Finally, under best conditions (60 : 40 ethanol-water, 175 °C, 0.25% H_2SO_4), cellulose yield and purity reached 82% ± 3% and 71% ± 3%, respectively.

Keyword : Organosolv pretreatment, Mixed sawdust, Cellulose, Ethanol, Lignin

III.1 Introduction

Shortage of fossil energy and increasing concerns regarding environmental pollutions have caused a rising interest in renewable energy research in many countries . In France, as in many other countries, bioethanol is considered as a promising renewable fuel because of its heat and power potential aspects obtained through a combustion process (Zhao et al.; 2009).

Bioethanol can be produced from different resources. Therefore, depending on the resources, it is called either first-generation or second-generation bioethanol. First-generation bioethanol is produced from edible food crops, such as corn, beef, sugar cane, etc., while second-generation ethanol derives from lignocellulosic biomass or agricultural residues that do not compete with agri-food production. The latter is the most interesting because lignocellulosic biomass repre-

1. Corresponding Author : christophe.vial@uca.fr

sents one of the most abundant renewable resources on Earth and certainly one of the most affordable. It is estimated a worldwide production of 200.10^9 dry tons a year (Kuhad and Singh; 1993). A wide variety of substrates may be considered, such as softwood and hardwood, agricultural byproducts, such as wheat straw and corn stover, or even lignocellulosic waste generated by pulp, sawmill, and agricultural industries. Their conversion to ethanol as a biofuel could satisfy a wide part of the global energy demand, still essentially covered by-products derived from oil, while generating a new opportunity for the forest and agricultural sector. However, the chemical structure of lignocellulose, mainly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin, makes it recalcitrant to deconstruction, thereby limiting enzyme ability to convert cellulose and hemicellulose into fermentable sugars (Mupondwa et al.; 2017). This constitutes both a technological and economic issue to the development of second-generation biofuels. Owing to these structural characteristics, biomass pretreatment is, thus, an essential step to break down the lignin structure and simultaneously disrupt the crystalline structure of cellulose for enhancing enzyme accessibility to cellulose during the hydrolysis step (Alvira et al.; 2010).

In the last decades, various biomass pretreatment methods were developed. One of these, the Organosolv process, appears to be an attractive and eco-friendly method to remove lignin from lignocellulose materials using organic solvents in order to purify cellulose (Akgul and Kirci; 2009; Zhao et al.; 2009). This process was originally developed as an alternative treatment in the pulp and paper industries (Kleinert; 1974). Most of the employed solvents can be easily removed and recycled due to their low boiling point. Commonly used organic solvents are ethanol, methanol, glycerol, acetone, organic acids, or a mixture of water/organic solvent at a high temperature ranging from 100 to 250 °C, using a long extraction time between 30 and 120 min, and a solid-liquid ratio from 1 :20 to 1 :5 Borand and Karaosmanoğlu (2018). In the case of ethanol-water solvent, an acid catalyst (mainly H_2SO_4 or HCl, 0.5–2.0 % w/w) has often been added because non-catalyzed conditions typically require more severe conditions. In the 1990s, several processes had reached industrial production : the ORGANOCELL process using methanol (Lindner and Wegener; 1990, 1988, 1989), the ALCELL process using ethanol (Pye; 1990), and the MILOX process using peroxyformic acid (Seisto et al.; 1997), but for pulp and paper, they often failed to achieve economic sustainability in comparison to alternative Kraft, sulfite or soda pulp processes. Organosolv pretreatments constitute, however, an attractive alternative for the production of second-generation bioethanol because they can provide both cellulose and lignin with high purity, and minimize at the same time the production of fermentation inhibitors Mupondwa et al. (2017). In practice, ethanol Organosolv pretreatment has been the most commonly applied to a wide range of lignocellulose feedstocks, including hardwood and softwood. Typical pretreatments conditions used for different woody biomass. Bouxin et al. (2014) pretreated Sitka spruce with an ethanol-water ratio ranging 50–70% v/v while using 0.75–1.25% H_2SO_4 for a temperature range of 165–205 °C for 40–94 min. As a result, they recovered a pulp with 18–24% w/w residual lignin. Mabee et al. (2006) used 50% v/v ethanol to treat Douglas fir feedstock at pH 2 (H_2SO_4). They varied temperature from 181 to 202 °C and the reaction

time from 14 to 90 min. In this case, they recovered a pulp containing 90% cellulose.

In this work, the goal is, therefore, to fractionate an industrial and readily available sawmill feedstock (a mixed sawdust consisting of four softwood species : fir, spruce, Scots pine, and Douglas fir) in a perspective of cellulose recovery and purification for bioethanol production through an "Organosolv pretreatment" based on an original microwave heating system, also called dielectric heating (Xu; 2015). The novelty and originality of this study, thus, result from two main points. First, mixed feedstocks have not been investigated up to now, except by (Pan et al.; 2005) . However, in many countries of the world, dealing with a mixed feedstock including several wood species is compulsory for economic and environmental reasons because each species is not abundant enough within a distance lower than 100 km for supplying a wood biorefinery. Secondly, hybrid microwave-assisted Organosolv processes have also been disregarded in the literature up to now, as only the works of (Gong et al.; 2010; Liu et al.; 2010) can be found, dealing with organic acid on rice straw and aqueous glycerol solutions on recalcitrant softwood, respectively.
In the present study, an original ethanol microwave-assisted Organosolv pretreatment was applied to the sawmill feedstock. Organosolv cellulose recovery yield and purity were investigated as a function of the operating parameters, but also the formation of fermentation inhibitors and lignin recovery yield, as lignin valorization may also constitute a key point in the economic sustainability of bioethanol production from wood.

III.2 Materials and methods

III.2.1 Materials : feedstocks and reagents

Samples of mixed sawdust from four softwood species were used in this study : fir, spruce (Picea abies), Scots pine (Pinus sylvestris), and Douglas fir. The mixture was provided by a local sawmill company (Les Scieries du Centre Marcel Esbelin et Cie), located in Cournon d'Auvergne (France), which has been extracted from a monthly feedstock. Ethanol, sulfuric acid, sodium chlorite, and other chemicals (reagent grade) were purchased from Sigma-Aldrich (France).

III.2.2 Feedstock chemical characterization

After oven-drying at 110°C until constant weight has been achieved, and further removal of any visible bark material, the dried mixed sawmill sawdust was ground using a ball mill (BM500, Anton Paar GmbH, Austria) to a granulometry lower than 1 mm and screened to obtain sawdust with an average size of 0.5mm.
Ash content was determined, first, according to NREL standard method (Sluiter; 2008) by complete incineration of 2 g sawdust in a muffle furnace at 525 °C for 6 h, by weighing the residues. The extractives were determined by successive Soxhlet extractions, first with dichloromethane for 6 h, then with ethanol for 6 h, and finally with water for 8 h. After each extraction, the

samples were oven-dried at 110 °C and weighed (Sluiter; 2008).
The lignin content was determined using the Klason method according to (Sluiter; 2008). In this method, 200 mg of free extractives sawdust was hydrolyzed with 2 mL of concentrated sulfuric acid (72% w/w) at 30 °C in a water bath. After 1 h, the mixture was diluted to a concentration of 4% w/w by adding 56 mL of pure water, and then autoclaved at 125 °C for 1 h. The sample was filtered through a crucible using a vacuum pump. The solid residue, referred to as Klason lignin, was washed with distilled water ; the crucible was placed in an oven at 110 °C overnight and, then, weighed. The hydrolysate was sampled to determine the acid-soluble lignin by measuring its absorbance at 205 nm using a UV/Vis spectrophotometer.
The holocellulose (i.e., cellulose and hemicelluloses) content was determined using sodium chlorite as a delignification reagent according to Browning method (Browning; 1967; Rowell; 1980). This method consisted in treating 1 g of sample in 32 mL of distilled water, in which 0.2 mL of acetic acid and 0.4 g of sodium chlorite were added in a pressure tube. The mixture was then heated in a water bath at 70°C equipped with a shaker for 6 h–8 h ; after each hour, the same amount of acetic acid and sodium chlorite was being added until bleaching was achieved. After 6–8 h reaction, almost all of the lignin was generally removed. The tube was then removed from the water bath and allowed to cool down at room temperature. The mixture was filtered under vacuum using a filter crucible (Porosity 3). The solid residue was first washed with distilled water, and then with acetone, oven-dried at 110 °C and weighed. Finally, the cellulose (i.e., $\alpha - cellulose$) content was determined using an alkali hydrolysis with NaOH 27% for 1 h. This allowed the release of the hemicellulose fraction from the holocellulose. The solid phase was recovered by filtration, washed, dried and weighed.

All these experiments were carried out in triplicate.

III.2.3 Organosolv pretreatment

The Organosolv pretreatment experiments were performed in a microwave reactor system (Monowave 450, Anton PaarGmbH, Austria) equipped with an autosampler for up to 24-closed-vessel easily queued and processed automatically. As this work is a preliminary study on the hybrid microwave-assisted Organosolv pretreatment, the main operating parameters and their respective range had to be defined from the state of the art on Organosolv pretreatment, and then assessed from preliminary treatments that are not detailed in this paper. Finally, the sawdust mixture (same granulometry as in Section III.2.2) was suspended in an ethanol-water mixture as the solvent with a fixed solid-to-liquid ratio (S/L=1 :15 g dry weight sawdust/15 mL solvent) and a fixed treatment time (60 min). A variable sulfuric acid (H_2SO_4) concentration (0, 0.25, 0.5, 0.7, 1% w/w) was used as a catalyst ; several ethanol-water ratios (40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30, 80 : 20 v/v) and temperature conditions (175 and 190 °C) were applied. A control program with the appropriate temperature, ramp time, treatment time, and cooling time was defined. For all the experiments, the reactor was heated to the appropriate temperature for a constant treatment time of 60 min, with a ramp time of 15 min for reaching the target

temperature (Fig. III.1). A key advantage of microwave-assisted heating was to achieve a fast temperature ramp : for example, Park et al. (2010) when treating Pitch pine (50% v/v ethanol, 1% w/w H_2SO_4) for a range temperature 150–210 °C) applied a treatment time lower than 20 min, which may appear short in comparison to this work, but after a 50 min heating ramp to reach the treatment temperature ; this highlights that the length of a treatment cycle was very close to the present work.

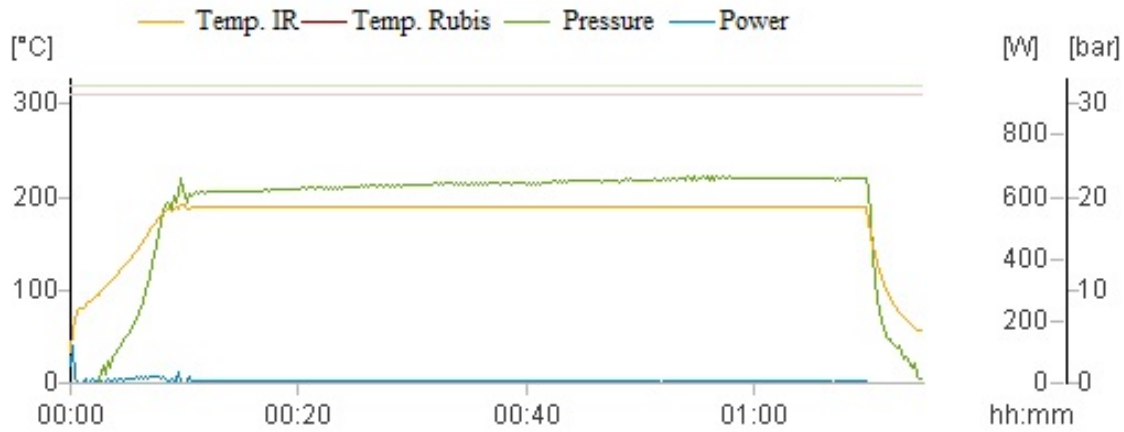


FIGURE III.1: Temperature, pressure and power profile recorded during the Organosolv microwave assisted pretreatment

Each pretreatment was carried out in 10 borosilicate glass vessels of 30 mL under our investigation conditions including substrate concentration, temperature, time, and acid concentration, as defined above. According to the S/L ratio, ground mixed sawdust samples were accurately weighed and transferred to the borosilicate glass extraction vessels. The sulfuric acid solutions at different concentrations were added to each sample (1 mL) to reach a volume about 20 mL suspension for all treatments, i.e. which occupies nearly 66% of the borosilicate vessel volume. The extraction vessels were sealed, and the mixtures were homogenized with a magnetic stirrer for all the pretreatment period. Then, the microwave extraction process was applied according to the experimental conditions. Due to heating, pressure increased in the sealed vessel (Fig.III.1), but was an uncontrolled variable that could only be measured over time and resulted from temperature and solvent composition ; in practice, pressure reached a nearly constant value within the 60 min when treatment temperature was constant, as illustrated in Fig.III.1. Power consumption was also recorded over time, but remained very low except in the first minute of the heating ramp, as highlighted by Fig.III.1. Finally, the extraction vessels were allowed to cool down to room temperature (air cooling) before removal from the system and the mixture was filtered using a crucible (Porosity 3). The solid fraction called “pulp” recovered after the thermomechanical Organosolv treatment was washed with hot water to remove residual lignin, dried and weighed so as to measure the mass of remaining solid. This solid phase was then submitted to cellulose, hemicellulose, and residual lignin chemical analyses already described in Section III.2.2. The performance of the Organosolv pretreatment was assessed by estimating

cellulose recovery yield and cellulose purity in the remaining solid fraction, defined as follows :

$$\textbf{Cellulose yield (\% w/w)} = \frac{Cellulose\ content\ in\ the\ remaining\ solid\ (g)}{Initial\ Cellulose\ amount\ in\ the\ raw\ sawdust\ (g)} \quad \text{(III.1)}$$

$$\textbf{Cellulose purity (\% w/w)} = \frac{Cellulose\ content\ in\ the\ remaining\ solid\ (g)}{Mass\ of\ the\ remaing\ solid\ (g)} \quad \text{(III.2)}$$

The liquid phase (black liquor) was sampled to investigate the formation of fermentation inhibitors, such as furfural and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) using an Agilent HPLC system (1100 Series) fitted with a Luna®C18 column (Phenomenex, USA) operated at 80 °C and a UV detector used at 280 nm. Distilled water, methanol and acetic acid (80 :10 :3 : v/v/v) were used as the eluent at a flow rate of 0.5 mL/min. Appropriately diluted aliquots (20 μL) were injected after passing through a 0.20 μm syringe filter. The remaining liquor was added to three volumes of acidic water (pH 2) to promote the precipitation of the lignin. The precipitated lignin was then recovered, dried (105 °C), and weighed after centrifugation, filtration and washing processes. Lignin recovery yield was expressed as follows :

All the experiments were carried out in triplicate ; confidence intervals could then be deduced based on standard deviation

III.3 Results and discussion

III.3.1 Chemical composition of the sawmill mixed feedstocks

Table III.1 displays the mixed sawmill feedstock composition prior to pretreatment deduced from chemical analyses. Due to the lack of studies involving such a mixture in the literature, the chemical composition of the mixed sawdust was compared to the composition reported in the literature of the different softwood species that composed the mixture in order to validate the chemical characterization analyses. Roughly, the composition of the mixed sawdust appears to lie between the values found in the literature and reported in Table III.1 for three softwood species of the mixture for cellulose and lignin, while experimental data are just above the maximum value from the literature for hemicelluloses. This highlights that chemical analyses are consistent with literature data.

III.3.2 Effect of sulfuric acid and temperature on the Organosolv pretreatment

The Organosolv pretreatment assays were conducted, first, at constant ethanol-water ratio, 60 : 40 v/v, under the preselected conditions of Section III.2 in terms of sulfuric acid concentration (0%, 0.25%, 0.50%, 0.75% and 1% w/w) and temperature (175 °C and 190 °C) using the assisted-microwave reactor for heating.

Table III.1: Chemical composition of the mixed sawmill feedstocks (% w/w of the initial dry sawdust feedstock)

Composition % w\w	Mixed sawdust [a] of this work	Spruced Butler et al. (2013)	Pinus sylvestris Pettersen (1984)	Douglas fir Mabee et al. (2006)
Extractible (dichloromethane, ethanol, water)	3.2 ± 0.2	3.45	2.6	
Cellulose	44.3 ± 0.5	49.42	47	43
Hemicelluloses	25.6 ± 0.2	23.68	22.2	23
Insoluble lignin	26 ± 3	27.33	28	28
Ash content	0.3 ± 0.2		0.2	

[a] Standard deviation is based on experimennts out in triplicate.

III.3.2.1 Effect on cellulose yield and purity

Experimental results are summarized in Table III.2. First, this table shows that without a catalyst, the mass of remaining solid recovered decreased moderately from 80% ± 2% to 73% ± 4% when the temperature was increased from 175 to 190 °C, which highlights that temperature favors slightly wood fractionation. From chemical analyses, it arises, however, that cellulose yield decreased at the same time from 98% ± 2% to 89% ± 3%. So, without catalyst, higher temperature reduced cellulose recovery yield, while purity in the solid phase was not improved, about 54% ± 2% for both temperatures. As an increase in temperature also induced an increase in pressure (Table III.2), both effects could not be distinguished.

Table III.2: Experimental design and results on the solid phase recovered after microwave-assisted Organosolv pretreatment of mixed sawdust.

Ethanol-water ratio (v/v) w/w	Temperature (°C)	H_2SO_4 (% w/w)	Pressure (bar)	Solid fraction (g/100 g of raw sawdust)				Cellulose recovery yield (%)	Cellulose purity in the solid fraction (%)
				Remaining solid	Cellulose	Hemicellulose	Klason lignin		
60 :40	175	0	18.00 ± 0.01	80.2 ± 2.2	43.2 ± 0.8	15.3 ± 1.1	16.7 ± 0.1	97.5 ± 1.9	53.9 ± 1.3
		0.25	17.55 ± 0.01	52.5 ± 4.1	32.8 ± 3.6	8.9 ±0.8	9.3 ± 0.6	74.1 ± 3.2	62.5 ± 2.5
		0.5	17.94 ± 0.01	51.2 ± 2.5	32.7 ± 0.3	8.6 ±1.9	7.9 ± 0.8	73.8 ± 1.9	63.8 ± 2.6
		0.75	18.19 ± 0.01	48.7 ± 2.0	31.2 ± 0.1	7.9 ±0.3	9.9 ± 1.6	70.5 ± 2.1	65.1 ± 2.9
		1	17.87 ± 0.01	45.8 ± 3.6	29.8 ± 4.1	7.3 ±1.1	8.5 ± 0.8	67.3 ± 3.5	54.2 ± 3.1
	190	0	23.72 ±0.01	73.0 ± 3.8	39.6 ± 1.6	14.2 ± 1.9	15.4 ± 0.8	89.4 ± 3.0	60.6 ± 1.5
		0.25	23.8 ± 0.01	49.8 ± 0.2	30.1 ± 0.3	10.1 ± 0.1	7.9 ± 0.2	68.1 ± 1.8	60.6 ± 2.8
		0.5	24.50 ± 0.01	42.8 ± 2.7	21.9 ± 1.7	13.3 ± 1.6	6.5 ± 0.7	49.5 ± 3.6	51.2 ± 3.5
		0.75	24.59 ± 0.01	39.3 ± 0.4	25.1 ± 0.7	6.3 ±0.3	7.0 ± 0.40	56.6 ± 3.4	63.7 ± 4.1
		1	24.25 ± 0.01	19.1± 3.3	6.1 ± 4.3	2.4 ± 4.52	11.4 ± 1.13	14 ± 4	31 ± 5
40 :60	175	0.25	15.63 ± 0.01	66.9 ± 2.7	39.3 ± 3.7	6.1 ± 2.53	22.7 ± 1.2	88.8 ± 3.9	59 ± 2
50 :50			16.82 ± 0.01	60.9 ± 0.8	37.3 ± 1.9	6.5 ± 0.5	14.9 ± 0.1	84.3 ± 3.5	61.2 ± 2.0
60 :40			17.35 ± 0.01	51.6 ± 1.2	36.5 ± 1.6	5.1 ± 1.3	10.2 ± 0.6	82.4 ± 3.3	70.6 ± 3
70 :30			18.36 ± 0.01	67.1 ± 1.2	38.6 ± 0.7	6.6 ± 1.7	13.1 ± 1.3	87.1 ± 3.4	66.3 ± 2
80 :20			18.75 ± 0.01	55.1 ± 2.5	38.5 ± 3.7	6.6 ± 2.9	13.2 ± 0.9	86.9 ± 3.1	66.0 ± 2

Conversely, the addition of the catalyst, even at the smallest quantity of 0.25% w/w, induced a steep decrease of the mass of remaining solid after pretreatment. The same trend could be observed for cellulose yield between 0% and 0.25% catalyst content, but not for purity that increased with acid concentration for both temperatures. As the addition of sulfuric acid concentration increased (0.25, 0.5, 0.75 and 1%), the amount of remaining solid always decreased, but the decrease remained moderate at 175 °C (from 52% ± 4% to 46% ± 4%), while a steep fall was observed at 190 °C (from 49.8% ± 0.2% to 19% ± 4%) in Table III.2. A careful analysis of the chemical composition of the remaining solid is described in Fig. III.2. According to Fig. III.2a, the cellulose, hemicellulose and lignin contents were almost stable as the sulfuric acid concentration increased at 175 °C ; only the amount of impurities clearly decreased when catalyst concentration was increased. Conversely, it can be noticed in Fig. III.2b a sharper evolution of the chemical composition at 190 °C compared to that at 175 °C. In practice, the increase of H_2SO_4 content at 190 °C did not improve purity and finally lead to a remarkable decrease in cellulose and hemicellulose content when 1% w/w acid was used. Similar results were also observed by Pan et al. (2007) when using sulfuric acid as the catalyst and by Park et al. (2018) using peroxide as a catalyst. This important decrease may be due to the combined increase of two major Organosolv pretreatment parameters (temperature and sulfuric acid concentration), which rather than allowing just the lignin degradation, appear to degrade both lignin and cellulose at the same time. At 190 °C, the lignin content in the pretreated substrate at maximum sulfuric acid (1% w/w) was found to be higher than cellulose content. According to Pan et al. (2007, 2006) the explanation of this behavior is that carbohydrates are hydrolyzed faster than lignin at high temperature, which results in a relative increase in residual lignin from the solid fraction. Conversely, as pressure was insignificantly affected by the acid content, pressure could not explain the variability of cellulose yield and purity in Section III.3.2 ; the same conclusion stands for lignin recovery and inhibitor formation.

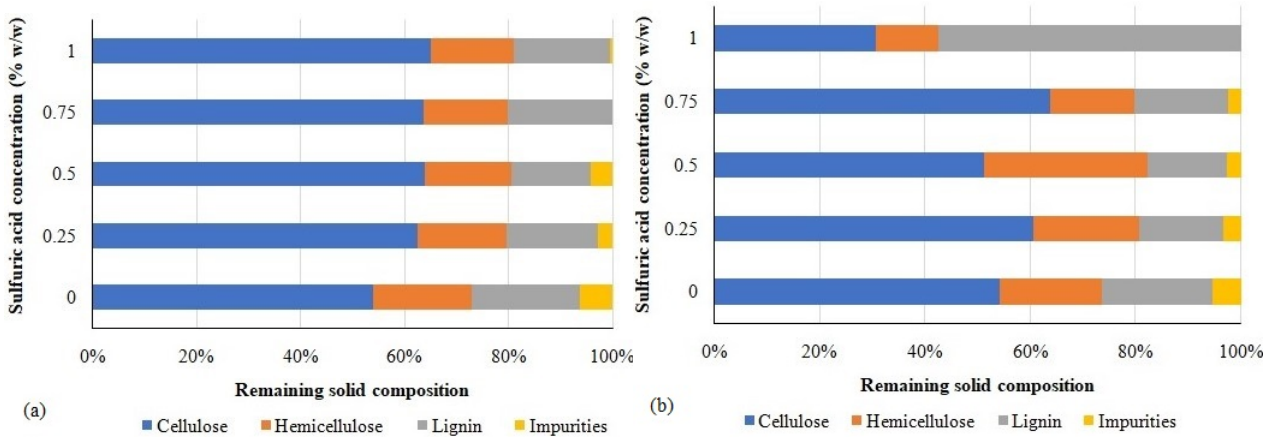


FIGURE III.2: Effect of sulfuric acid and temperature on the chemical composition of the substrate after the Organosolv pretreatment, (a) : 175 °C and (b) : 190 °C.

As a result, it emerges from these results that cellulose recovery and yield are both favored by

a sma ll addition of catalyst in the microwave-assisted Organosolv treatment, but that working at 190 °C is useless.

III.3.2.2 Effect on the Organosolv lignin recovery

Organosolv pretreatments are also known to provide high-quality lignin with a good purity. This may be an advantage for the economic sustainability of the process. For this reason, lignin recovery has also been investigated. Table III.3 presents the evolution of Organosolv lignin recovery yield as a function of sulfuric acid for both temperatures. Regarding the results, it appears that without sulfuric acid, Organosolv lignin yield is very low, but increases with temperature from 13.1% ± 0.9% to 26% ± 1% w/w on the basis of the total lignin from the raw sawdust feedstock. However, the yield more rapidly increased with increasing catalyst concentration because acid is known to promote cleavage and lignin dissolution. Furthermore, an increase in lignin yield was also observed as the temperature rose in the presence of catalyst. Consequently, the maximum Organosolv lignin recovered was usually obtained between 0.75 and 1% H_2SO_4 for both temperatures, with an overall maximum of about 57.5% ± 0.4 % at 190 °C (Table III.3). A comparison with literature data shows that this value is higher than in Organosolv pretreatments aimed at bioethanol production (see, e.g., Almengor et al. (2012)), but lower than when lignin production is targeted (e.g., in the data reviewed by Borand and Karaosmanoğlu (2018)), as expected.

According to these results, it appears that sulfuric acid used as a catalyst for the Organosolv fractionation at different concentrations (0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1% w/w) is an influential parameter for the delignification of the sawdust feedstock and for an efficient recovery of purified lignin. This was confirmed by Sun and Cheng (2002) : the addition of an acid catalyst to pulping media causes the cleavage of more ether-linkages, but also favors the occurrence of intramolecular condensation reactions, giving rise to an enhanced cellulose-lignin separation and a more complex lignin structure. To assess the quality of the Organosolv lignin recovered in this work, infrared spectra measurement using an FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection) equipment (Vertex 70 from Bruker, Germany) were confronted to those of a commercial lignosulfonic acid sodium salt (Sigma-Aldrich, France). The current publication provides a Supplementary figure (a typical example of comparison IR-spectra between commercial lignosulfonic acid sodium salt from Sigma-Aldrich (France) and our Organosolv lignin obtained during pretreatment) that shows that the IR spectra are very similar, highlighting the quality of the lignin recovered by the Organosolv treatment.

Table III.3: Experimental design and results on the liquid phase recovered after microwave-assisted Organosolv pretreatment of mixed sawdust.

Ethanol-water ratio (v/v) % w/w	Temperature (°C)	H_2SO_4 (% w/w)	Liquid fraction "black liquor" (g/100g of raw sawdust)			Lignin recovery yield (%)
			Organosolv lignin	Furfural	5-HMF	
60 :40	175	0	3.5 ± 0.4	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.06	13.1 ± 0.9
		0.25	11.8 ± 0.3	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.05	44.5 ± 0.5
		0.5	11.9 ± 0.4	0.40 ± 0.07	0.58 ± 1.41	44.9 ± 0.5
		0.75	12.3 ± 0.8	0.46 ± 0.14	0.85 ± 0.13	46.3 ± 0.5
		1	13.2 ± 0.4	0.55 ± 0.12	1.00 ± 0.04	49.6 ± 0.4
	190	0	6.9 ± 0.4	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.1	25.9 ± 1.0
		0.25	11.8 ± 0.1	0.45 ± 0.04	0.92 ± 0.02	44.4 ± 0.5
		0.5	14.1 ± 0.4	0.61 ± 0.06	1.30 ± 0.3	53.2 ± 0.1
		0.75	15.3 ± 0.2	0.70 ± 0.02	1.41 ± 0.06	57.5 ± 0.4
		1	15.0 ±0.6	0.78 ± 0.00	1.55 ± 0.00	56.4 ± 0.2
40 :60	175	0.25	6.8 ± 0.6	0.17 ± 0.00	0.26 ± 0.00	25.7 ± 0.6
50 :50			7.3 ± 0.0	0.15 ± 0.00	0.24 ± 0.01	27.4 ± 0.5
60 :40			11.9 ± 0.3	0.23 ± 0.02	0.30 ± 0.031	44.7 ± 0.5
70 :30			12.0 ± 0.7	0.11 ± 0.0	0.16 ± 0.00	45.2 ± 0.3
80 :20			13.1 ± 0.4	0.09 ± 0.0	0.08 ± 0.00	49.2 ± 0.6

III.3.2.3 Effect on inhibitor formation

Under severe pretreatment conditions such as long reaction time, high temperature and acid concentration, typical for Organosolv pretreatment, the pentoses resulting from hydrolysis of the hemicelluloses undergo dehydration with formation of 2-furaldehyde, hereafter referred to as furfural, while the hexoses are dehydrated to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, hereafter referred to as HMF (Pan et al. (2007); Jönsson and Martín (2016). These compounds may have a negative impact on the downstream hydrolysis and fermentation processes. Table III.3 highlights the evolution of furfural and HMF concentration in the solvent after pretreatment at 175 °C and 190 °C as the sulfuric acid concentration augments. According to experimental data, very low concentrations of furfural and HMF were produced at 175 °C without catalyst. However, these concentrations increased as the sulfuric acid concentration increased. Moreover, the same behavior was observed at 190 °C with almost twice the amount of each component compared to the quantity measured at 175 °C. These results were confirmed by Harmsen et al. (2010) who reported that furfural and HMF formation were enhanced at higher temperature and treatment time, and by Agbor et al. (2011) concerning the increase in acidic concentration. Kim (2018) when treating *Miscanthus x giganteus* explained this result by the increase in hydronium ion concentration in water at high temperature. Finally, these results confirm the conclusion of Section III.3.2.1 which claims that high temperature must be avoided.

III.3.3 Effect of ethanol-water ratio on the Organosolv pretreatment

For bioethanol production, the downstream pretreatment processes require, as much as possible, to recover an insoluble fraction which consists mostly of cellulose, together with some minor amounts of unhydrolyzed hemicelluloses and some residual lignin Arato et al. (2005). In the previous section, our findings revealed that the increase of both acid concentration and temperature improved the recovery of Organosolv lignin, i.e. the delignification yield, but hampered the recovery of the solid fraction, particularly cellulose which was being degraded in the process when severe conditions of temperature and acid content were applied simultaneously. So, a trade-off is necessary between cellulose purity and cellulose recovery in the solid fraction for subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation steps. From Table III.2, Table III.3, the treatment with 0.25% w/w sulfuric acid at 175 °C emerges as a good trade-off between cellulose purity (about 63%) and yield (about 74 %), while inhibitor formation remained rather limited. So, further experiments investigating the ethanol-water ratio between 40 : 60 and 80 : 20 v/v were carried out at a fixed temperature (175 °C) and catalyst content (0.25% w/w).

III.3.3.1 Effect on cellulose yield and purity

The effect of ethanol-water ratio on the amount of remaining solid and on its chemical composition is summarized in Table III.2 and in Fig. III.3, respectively. Contrary to the observations made in Section III.3.2.1, the mass of solid recovered varied less significantly as a function of the ethanol-water ratio than as a function of catalyst content, between 55% ± 2% and 67% ±

3%. It emerges that cellulose dissolution was not enhanced by the increase in ethanol content and remained nearly constant, about 37–39 g cellulose per 100 g sawdust feedstock (Table III.2). The amount of impurities also decreased when ethanol concentration was increased (Fig. III.3).

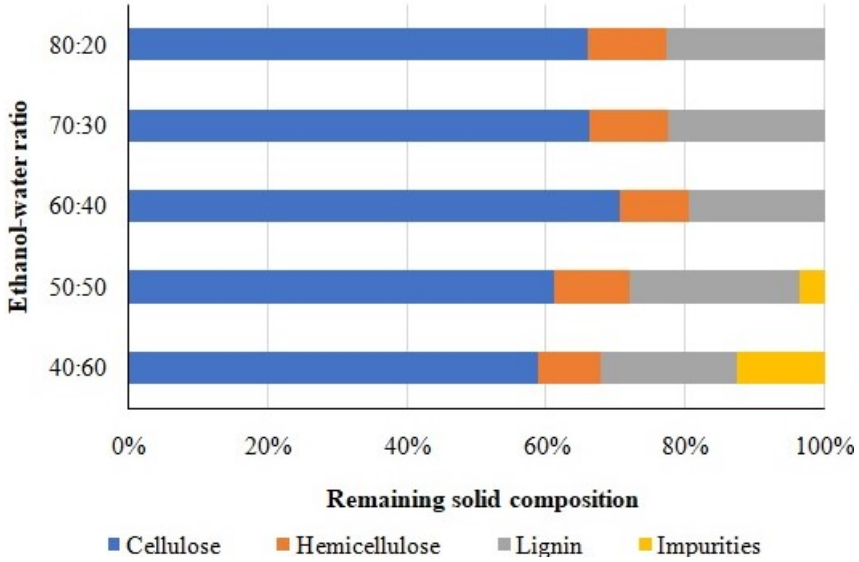


FIGURE III.3: Effect of ethanol-water ratio on the chemical composition of the substrate after the Organosolv pretreatment at 0.25% w/w sulfuric acid and 175 °C.

Cellulose purity lay between 59% ± 2% and 71% ± 3%, with a maximum achieved for 60 :40 v/v ethanol-water ratio. Conversely, lignin content in the solid phase was almost halved in comparison to the raw sawdust, highlighting a very good delignification yield under this condition. These results are in agreement with the review paper from Borand and Karaosmanoğlu (2018) in which the optimum ethanol-water ratio is always between 40 : 60 and 60 : 40 for woody biomass. According to Pan et al. (2007), with the increase of ethanol-water ratio, the lignin binding the cellulose fibers together is removed in a manner that substrates were defibered, thus resulting in more cellulose than when catalyst content and temperature were increased. Table III.2 reveals, however, that when ethanol content was higher than 60% v/v, the effect of ethanol remained weak for the sawdust mixture studied in this work, so that the best condition can be defined with a 60% v/v concentration of ethanol in the solvent, which makes solvent regeneration easier in the process.

III.3.3.2 Effect on the Organosolv lignin recovery

For the liquid phase, Table III.3 summarizes the amount of lignin that can be recovered by precipitation as Organosolv lignin for 0.25% w/w sulfuric acid at 175 °C as a function of ethanol-water ratio. According to these data, it can be observed that any increase in ethanol-water ratio improved the recovery of the Organosolv lignin recovery yield. Obviously, it can be pointed out that lignin yield was above 44% when ethanol content was 60% v/v or higher, and the maximum lignin yield, 49.2% ± 0.6%, was achieved at the highest ethanol-water ratio 80 :20 v/v. But an efficient lignin recovery, about 45.2% ± 0.3% yield, could also be achieved using lower ethanol

concentration in an economic perspective. Nevertheless, the ethanol-water ratio increase was found to be an important parameter for promoting lignin solubilization of sawdust feedstock, while preventing cellulose dissolution, because it allowed increasing the lignin solubility without an intense dissolution of cellulose from the raw sawdust, contrary to high-temperature condition or high catalyst content in Table III.2. These results are in accordance with those reported by Domínguez-Robles et al. (2018) in a solvent fractionation process using acetone-water, and those reported by Ni and Hu (1995) using ethanol-water as the solvent. According to both studies, the solubility of the lignin was usually improved with increasing the concentration of the organic solvent. However, Gonçalves and Ruzene (2003) claimed that the reason for enhanced lignin dissolution was mainly the increase in pressure in the Organosolv pretreatment reaction vessel which was observed when increasing ethanol-water ratio at constant treatment temperature. This increase in pressure, from 15.6 to 18.8 bars, was also observed in this work (Table III.2), but process condition made it not possible to distinguish the chemical effect of the solvent from the physical effect of pressure on enhanced lignin recovery. From a mass balance on lignin in the solid and the liquid phase in Table III.2, Table III.3, it emerged, however, that more lignin was recovered in both phases when the ethanol content was increased in the solvent, which means that ethanol probably prevented lignin degradation in the Organosolv pretreatment. However, accounting for cellulose and lignin recovery with cellulose purity, it arises that 60 :40 ethanol-water ratio constitutes a good trade-off, in agreement with conventional Organosolv pretreatments from the literature.

III.3.3.3 Effect on inhibitor formation

Finally, Table III.3 describes the inhibitor formation due to Organosolv pretreatment using 0.25% w/w sulfuric acid at 175°C, with ethanol-water ratio as the variable parameter. The main outcome is that furfural and HMF production remained low and even decreased with increasing ethanol concentration, especially above 60% ethanol, which is a beneficial effect because furfural and HMF at high concentration are toxic for hydrolysis and fermentation processes. This may be due to the reduced degradation of carbohydrates, which agrees with the lower degradation of lignin discussed in Section III.3.3.2 at increasing ethanol content. Kim (2018) also attributed the decrease in inhibitor formation at increasing ethanol content to the reduced formation of hydronium cations when water content decreases.
Thus, experimental data confirm that increasing ethanol content enhances lignin solubilization and cellulose purity in the solid phase (Table III.3), while preventing inhibitor formation at the same time (Table III.3), contrary to temperature and high acid concentrations that increase simultaneously lignin recovery and inhibitor formation.

III.3.4 Comparison with conventional Organosolv pretreatment

Based on the experimental results of previous sections reported in Table III.2, Table III.3, the microwave-assisted Organosolv pretreatment applied to the sawdust mixture was able to achieve

up to 82% ± 3% and 71% ± 3% cellulose recovery and purity in the solid phase, respectively, with very low quantities of inhibitors in the liquid phase (below 0.3 g/100 g of dry sawdust for 5-HMF and furfural). As highlighted by many studies, (Bouxin et al. (2014); Mabee et al. (2006) and reviews from the literature (e.g., Zhao et al. (2009); Borand and Karaosmanoğlu (2018)), a comparison with data on conventional Organosolv pretreatment is not straightforward because raw materials and solid-to-liquid ratio strongly vary, even though ethanol-water content and temperature remain in the same range. The maximum values of cellulose recovery and purity achieved in this preliminary work appear, however, to be among the highest in the field of woody biomass, and could probably be improved after process optimization. The same difficulty emerges when a comparison with alternative processes (steam explosion. . .) and even with other microwave ethanol-based Organosolv treatment is considered : literature on woody biomass is rather limited and does not involve ethanol-water solvent (Gong et al. (2010); Liu et al. (2010)), whereas microwave-assisted ethanol-Organosolv treatment has been applied recently to bagasse of Agave angustifolia, which differs significantly from softwood (Hernández et al. (2018)). Thus, an alternative method for comparison can be based on energy consumption. For example, the model developed by Mafe et al. (2015) for dilute acid pretreatments in water can be applied to estimate energy consumption of the microwave-assisted Organosolv treatment. This model accounts for heating energy, heat loss, heat recovery, treatment temperature, and solid-to-liquid ratio. In the conditions of this work (temperature, S/L ratio. . .), energy requirements of dilute acid treatment with 0.25% sulfuric acid w/w was estimated about 19.10^3 kJ/kg dry biomass. From power measurements, heating energy could also be deduced for the microwave-assisted Organosolv treatment of this work. However, power input for counterbalancing heat loss was very low and below the accuracy of the power measurement facility, so that the same assumptions on heat recovery and heat loss as in Mafe et al. (2015) were applied. The results showed that energy consumption ranged between $11.1\text{x}10^3$ and $13.4\text{x}10^3$ kJ/kg dry wood, which shows a significant decrease in comparison to dilute acid treatment, with a value about $12.5\text{x}10^3$ kJ/kg dry wood for the highest cellulose recovery yield of this work. As a result, microwave-assisted Organosolv pretreatment appears as a potential way to achieve at the same time high performance and reduced energy consumption. It must however be pointed out that the values estimated in this preliminary work, $12.5\text{x}10^3$kJ/kg and $19\text{x}10^3$ kJ/kg for microwave-assisted Organosolv and dilute acid treatment remain high in comparison to the optimized conditions of Mafe et al. (2015) in which values close to $3\text{x}10^3$ kJ/kg could be achieved when treatment time was reduced to 15 min and solid loading reached 30% w/w in dilute acid aqueous solutions. This highlights that further optimization of the Organosolv process must be conducted, increasing first solid-to-liquid ratio, and then, minimizing treatment time, to achieve process sustainability, in parallel to cellulose enzymatic hydrolysis into convertible sugars to assess the feasibility of alcoholic fermentation for bioethanol production.

III.4 Conclusion

Microwave-assisted heating appears as a versatile tool for Organosolv pretreatment of sawdust feedstock. Under the best conditions (60 : 40 ethanol-water, 175 °C, 0.25% H_2SO_4), cellulose yield and purity reached 82% ± 3% and 71% ± 3%, respectively. The use of acid catalyst appeared to be essential to enhance delignification at lower temperature, but high H_2SO_4 concentration promoted delignification, cellulose dissolution, and inhibitor formation. Increasing ethanol-water ratio could help reduce processing temperature because this promoted delignification without cellulose dissolution. Now, further studies focusing on pretreatment energy savings, cellulose enzymatic hydrolysis into convertible sugars, alcoholic fermentation for bioethanol production, are compulsory to assess process efficiency and sustainability.

III.5 Acknowledgments

This work was funded by Auvergne Rhône-Alpes Regional Council, and the European Regional Development Fund (FEDER/ERDF) to promote the valorization of local feedstocks (wood-wastes) on a regional scale.

III.6 Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.078.

Bibliographie

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment : Fundamentals toward application, *Biotechnology Advances* **29**(6) : 675–685.

Akgul, M. and Kirci, H. (2009). An environmentally friendly organosolv (ethanol-water) pulping of poplar wood, *Journal of Environmental Biology* **30**(5) : 735–740.

Almengor, M. E. M., González, P., Baeza, J. and Freer, J. (2012). Effect of Organosolv Process on Structural Characteristics and Enzymatic Digestibility in Pinus Radiata Wood, *Journal of Materials Research and Technology* pp. 112–125.

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, *Bioresource Technology* **101**(13) : 4851–4861.

Arato, C., Pye, E. K. and Gjennestad, G. (2005). The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124** : 871–882.

Borand, M. N. and Karaosmanoğlu, F. (2018). Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications : A review, *Journal of Renewable and Sustainable Energy* **10**(3) : 033104.

Bouxin, F. P., David Jackson, S. and Jarvis, M. C. (2014). Isolation of high quality lignin as a by-product from ammonia percolation pretreatment of poplar wood, *Bioresource Technology* **162** : 236–242.

Browning, B. (1967). *Methods of wood chemistry*, Vol. Vol. I. Wiley & Sons, interscience publishers edn, New York.

Butler, E., Devlin, G., Meier, D. and McDonnell, K. (2013). Characterisation of spruce, salix, miscanthus and wheat straw for pyrolysis applications, *Bioresource Technology* **131** : 202–209.

Domínguez-Robles, J., Tamminen, T., Liitiä, T., Peresin, M. S., Rodríguez, A. and Jääskeläinen, A.-S. (2018). Aqueous acetone fractionation of kraft, organosolv and soda lignins, *International Journal of Biological Macromolecules* **106** : 979–987.

Gong, G., Liu, D. and Huang, Y. (2010). Microwave-assisted organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw, *Biosystems Engineering* **107**(2) : 67–73.

Gonçalves, A. R. and Ruzene, D. S. (2003). Influence of pressure in ethanol/water pulping of sugarcane bagasse, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **105** : 10.

Harmsen, P. F. H., Huijgen, W., Bermudez, L. and Bakker, R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, *Biosynergy* .

Hernández, Y. R., García Serrano, L. A., Maruri, D. T., Jiménez Aparicio, A. R., Camacho Díaz, B. H. and Arenas Ocampo, M. L. (2018). Optimization of the Microwave-Assisted Ethanosolv Extraction of Lignocellulosic Compounds from the Bagasse of Agave angustifolia Haw Using the Response Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**(13) : 3533–3540.

Jönsson, L. J. and Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose : Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresource Technology* **199** : 103–112.

Kim, D. (2018). Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose : Inhibitor Effects and Detoxification Strategies : A Mini Review, *Molecules (Basel, Switzerland)* **23**(2).

Kleinert, T. (1974). Organolv pupling with aqueous alcohol., *Tappi Journal* **57** : 99.

Kuhad, R. C. and Singh, A. (1993). Lignocellulose Biotechnology : Current and Future Prospects, *Critical Reviews in Biotechnology* **13**(2) : 151–172.

Lindner, A. and Wegener, G. (1988). Characterization of Lignins from Organosolv Pulping According to the Organocell Process Part 1. Elemental Analysis, Nonlignin Portions and Functional Groups, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **8**(3) : 323–340.

Lindner, A. and Wegener, G. (1989). Characterization of Lignins from Organosolv Pulping According to the Organocell Process, Part 2. Residual Lignins, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **9**(4) : 443–465.

Lindner, A. and Wegener, G. (1990). Characterization of Lignins from Organosolv Pulping According to the Organocell Process. Part 3. Permanganate Oxidation and Thioacidolysis, *Journal of Wood Chemistry and Technology* **10**(3) : 331–350.

Liu, J., Takada, R., Karita, S., Watanabe, T., Honda, Y. and Watanabe, T. (2010). Microwave-assisted pretreatment of recalcitrant softwood in aqueous glycerol, *Bioresource Technology* **101**(23) : 9355–9360.
URL: *https ://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410012113*

Mabee, W. E., Gregg, D. J., Arato, C., Berlin, A., Bura, R., Gilkes, N., Mirochnik, O., Pan, X., Kendall Pye, E. and Saddler, J. N. (2006). Updates on softwood-to-ethanol process development, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129**(1) : 55–70.

Mafe, O. A. T., Davies, S. M., Hancock, J. and Du, C. (2015). Development of an estimation model for the evaluation of the energy requirement of dilute acid pretreatments of biomass, *Biomass & Bioenergy* **72** : 28–38.

Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S. and Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol : Part I : Pretreatment technologies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **72** : 178–190.

Ni, Y. and Hu, Q. (1995). Alcell® lignin solubility in ethanol–water mixtures, *Journal of Applied Polymer Science* **57**(12) : 1441–1446.

Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X. and Saddler, J. (2005). Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping : Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products, *Biotechnology and Bioengineering* **90**(4) : 473–481.

Pan, X., Gilkes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D. and Saddler, J. (2006). Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process : optimization of process yields, *Biotechnology and Bioengineering* **94**(5) : 851–861.

Pan, X., Xie, D., Yu, R. W., Lam, D. and Saddler, J. N. (2007). Pretreatment of Lodgepole Pine Killed by Mountain Pine Beetle Using the Ethanol Organosolv Process : Fractionation and Process Optimization, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **46**(8) : 2609–2617.

Park, N., Kim, H.-Y., Koo, B.-W., Yeo, H. and Choi, I.-G. (2010). Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (Pinus rigida), *Bioresource Technology* **101**(18) : 7046–7053.

Park, Y., Kim, J., Kim, T., Park, Y. C., Kim, J. S. and Kim, T. H. (2018). Pretreatment of Corn Stover Using Organosolv with Hydrogen Peroxide for Effective Enzymatic Saccharification, *Energies* **11**(5) : 1301.

Pettersen, R. C. (1984). The Chemical Composition of Wood, *The Chemistry of Solid Wood*, Vol. 207 of *Advances in Chemistry*, American Chemical Society, pp. 57–126.

Pye, E. K. R. T. I. (1990). The ALCELL process : a proven alternative to kraft pulping, *Pulping Conference : [proceedings] (USA)* .

Rowell, R. M. (1980). Distribution of reacted chemicals in southern pine modified with methyl isocyanate., *Wood Science* **13**(2) : 102–110.

Seisto, A., Poppius-Levlin, K. and T., J. (1997). Peroxyformic acid pulping of nonwood plants by the milox method. 1. pulping and bleaching, **80**(9) : 215–221.

Sluiter, A. (2008). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples : Laboratory Analytical Procedure (LAP) ; Issue Date : 12/08/2006, *Technical Report* p. 14.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review, *Bioresource Technology* **83**(1) : 1–11.

Xu, J. (2015). Chapter 9 - Microwave Pretreatment, Elsevier, Amsterdam, pp. 157 – 172.

Zhao, X., Cheng, K. and Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**(5) : 815–827.

Bilan

L'objectif de ce chapitre était de fractionner un mélange de sciure industrielle composé de quatre essences de résineux locales (sapin, épicéa, pin sylvestre et sapin de Douglas) dans une perspective de récupération et de purification de la cellulose pour la production de bioéthanol grâce à un "prétraitement Organosolv" basé sur un système original de chauffage par micro-onde, tout en préservant la lignine dans le but d'une valorisation matière.

Compte tenu des résultats de ce chapitre, plusieurs conclusions peuvent être tirées quant à l'influence des paramètres étudiés sur les performances du procédé de prétraitement Organosolv par chauffage micro-onde.
Dans les meilleures conditions observées (rapport 60/40 pour le mélange éthanol-eau, 175 °C, 0,25 % H_2SO_4 et durée 1h) :

- Le rendement et la pureté de la cellulose ont atteint respectivement 82 % ± 3 % et 71 % ± 3 %.
- L'utilisation d'un catalyseur acide semble indispensable pour améliorer la délignification à basse température, mais une concentration élevée en H_2SO_4 favorise la délignification, la dissolution de la cellulose et la formation d'inhibiteurs.
- L'augmentation du rapport éthanol-eau pourrait aider à réduire la température de traitement car elle favorise la délignification sans dégradation de la cellulose.

Toutefois, des essais expérimentaux d'hydrolyse enzymatique de la cellulose obtenue en sucres convertibles, puis de fermentation alcoolique pour la production de bioéthanol sont nécessaires pour compléter l'étude de l'efficacité réelle et la durabilité du procédé. Ces derniers points font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IV

Hydrolyse enzymatique et fermentation alcoolique

« Seulement ceux qui prendront le risque d'aller trop loin découvriront jusqu'où on peut aller »

Thomas Stearns Eliot

Sommaire

IV.1 Introduction **122**

IV.2 Materials and methods **124**

IV.2.1 Feedstocks and reagents 124

IV.2.2 Enzymes and other chemicals 125

IV.2.3 Enzymatic hydrolysis 125

IV.2.4 Fermentation 126

IV.2.5 Enzymatic hydrolysis and fermentation scale-up 126

IV.2.6 Sugar, ethanol and inhibitors quantification 126

IV.2.7 Data analysis and number of samples replicate 127

IV.2.8 Enzymatic hydrolysis kinetic modeling 127

IV.3 Results and discussion **128**

IV.3.1 Enzymatic hydrolysis 128

IV.3.1.1 Effect of size reduction on the dried substrate 128

IV.3.1.2 Effect of substrate humidity 129

IV.3.1.3 Effect of enzyme loading on the wet substrate 131

IV.3.1.4 Effect of wet substrate loading 132

IV.3.2 Fermentation tests in flasks 133

IV.3.3 Scale-up of the processes : enzymatic hydrolysis and fermentation . . . 134

IV.3.4 Model for enzymatic hydrolysis 135

IV.4 Conclusion **136**

IV.5 CRediT authorship contribution statement **137**

IV.6 Declaration of Competing **137**
IV.7 Acknowledgments **138**
IV.8 Experience complémentaires **138**
Bibliographie **138**

Préambule

A la vue des principaux résultats du chapitre III, il s'agira de démontrer dans ce chapitre que le produit obtenu à l'issue du prétraitement Organosolv est hydrolysable et que le produit de cette hydrolyse peut être fermenté en éthanol. Cette partie de notre travail sera donc tout d'abord consacrée au procédé d'hydrolyse enzymatique, puis à celui de fermentation alcoolique.

Le choix du procédé d'hydrolyse se justifie par l'utilisation d'enzymes industrielles de faible coût et produites en grande quantité. Un cocktail enzymatique connu sous le nom de Cellic Ctec 2 produit par Novozymes (Danemark) et commercialisé par la société Sigma-Aldrich a été utilisé pour le traitement du mélange de sciure prétraité dans les meilleurs conditions atteintes avec le prétraitement Organosolv. Nous avons sélectionné ces enzymes car elles correspondent à un mélange de cellulases, hemicellulases et β-glucosidases. En premier lieu, nous reporterons nos résultats expérimentaux obtenus sous différentes conditions (humidité, durée...) que nous comparerons avec des travaux similaires disponibles dans la littérature. En second lieu, un modèle cinétique de suivi d'hydrolyse basé sur nos résultats expérimentaux sera établi afin de prédire le taux de conversion de la cellulose en glucose.

Ensuite, le choix du procédé de fermentation alcoolique utilisé repose sur l'utilisation de la souche *Saccharomyces cerevisiae* comme agent de fermentation des hydrolysats liquides les plus concentrés en sucre obtenus précédemment. Dans cette partie, deux types d'essais de fermentation ont été réalisés : les premiers en Erlenmeyer de 125 mL et les seconds en bioréacteur de 500 mL.

Ce chapitre IV a été publié dans la revue Bioresource Technology. De plus, les principaux résultats ont été présentés sous la forme d'une communication orale au cours de la conférence nationale SFGP 2019 (XVIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, l'Usine du Futur) qui s'est déroulée à Nantes (France) du 15 au 17 octobre 2019.

Hydrolysis and fermentation steps of a pretreated sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery

M. ABDOU ALIO[a], O.-C. TUGUI[b], L. RUSU[b], A. PONS[a], Ch. VIAL[a, 1]

[a] Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut Pascal ; F-63000, Clermont Ferrand, France

[a] University "Vasile Alecsandri" of Bacău, Faculty of Engineering, Chemical and Food Engineering Department, Bacău, Romania

Abstract

The aim of this work was to demonstrate the feasibility of second-generation bioethanol production using for the first time a sawmill mixed feedstock comprising four softwood species, representative of biomass resource in Auvergne-Rhône-Alpes region (France). The feedstock was subjected to a microwave-assisted water/ethanol Organosolv pretreatment. The investigation focused on enzymatic hydrolysis of this pretreated sawmill feedstock (PSF) using Cellic® Ctec2 as the enzyme, followed by fermentation of the resulting sugar solution using Saccharomyces cerevisiae strain. The cellulose-rich PSF with 71% w/w cellulose content presented high saccharification yields (up to 80%), which made it perfect for subsequent fermentation ; this yield was predicted vs. time up to 5.2% w/v PSF loading using a mathematical model fitted only on data at 1.5%. Finally, high PSF loading (7.5%) and scaleup were shown to impair the saccharification yield, but alcoholic fermentation could still be carried out up to 80% of the theoretical glucose-to-ethanol conversion yield.

Keyword : Organosolv pretreatment, mixed sawdust, cellulose hydrolysis, fermentation, lignocellulosic bioethanol, maarouf

IV.1 Introduction

Biofuels, in particular second-generation biofuels, have gained interest from academic research, government, and large companies nowadays. Lignocellulosic biofuel production is indeed widely accepted in the society as it is perceived as non-competitive with agri-food (Bryngemark; 2019). Also, these biofuels represent a renewable option to replace the depleting oil supply and can help mitigate the climate change impacts resulting from fossil fuels. For low-cost biofuel production, lignocellulosic biomass is a potential candidate feedstock because its price is estimated as being the lowest compared to starch which is presently used to produce bioethanol (Chovau et al.; 2013).

1. Corresponding Author : christophe.vial@uca.fr

Auvergne Rhône-Alpes is one of the largest forest regions in France with a forest density estimated at 439.10^6 m^3. As a consequence, the local wood processing industries generate a significant amount of sawdust or other wastes that are not valorized otherwise than being burned for heat in this region. An alternative way of valorization of this waste is the production of second-generation bioethanol in order to develop a reliable and sustainable regional energy model that fits well with the energy transition policy and the fight against climate change. This could have the advantage of promoting the valorization of local wood waste with a view to setting up a forest biorefinery. Beyond the regional impact, large-scale second-generation biofuel facilities could also contribute to enhance the security of energy supply and, more generally, to strengthen the world economy (Sarks et al.; 2014).

To increase lignocellulose digestibility, numerous lignocellulose pretreatment methods have been matured. Among all the thermomechanical and chemical processes, Organosolv pretreatment can be considered to be an eco-friendly and attractive method to remove lignin from lignocellulose materials using pure or diluted organic solvents in order to purify cellulose (Akgul and Kirci; 2009; Zhao et al.; 2009). Thus, Organosolv pretreatments are very efficient techniques for the production of second-generation bioethanol because they can provide both cellulose and lignin with high purity, and minimize at the same time the production of fermentation inhibitors (Mupondwa et al.; 2017). As a subsequent step to pretreatment, hydrolysis transforms the cellulose and the remaining hemicelluloses into fermentable sugars. The enzymatic hydrolysis step has been recognized as a major techno-economic bottleneck in the whole wood-to-ethanol bioconversion process. For example, the enzymatic hydrolysis and fermentation of starch-based substrates (e.g. corn) are generally performed at a substrate loading greater than 20% solids, leading to a final ethanol content of the order of 10% (w/v) (Zhang et al.; 2009). Conversely, the standard enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass is generally carried out at a substrate proportion of less than 5% solids content. This results in a concentration of sugar lower than 4% (w/v) in the hydrolysate and, subsequently, an ethanol concentration less than 2% (w/v).

Elevating the substrate loading during the enzymatic hydrolysis will result in an increase in the concentration of sugar and a higher final ethanol concentration after fermentation. This strategy will allow cutting the costs of the bioconversion process, e.g. by reducing the operational and capital expenditures of hydrolysis and fermentation, and by saving energy in the distillation/evaporation and other downstream processes. When proceeding to a techno-economic assessment on enzymatic hydrolysis, Stenberg et al. (2000) and Wingren et al. (2003) reported that an augmentation in the proportion of the substrate from 5% to 8% (w/v) could diminish the total production cost by almost 20%. A further increase in the substrate proportion could then result in even greater savings. Nevertheless, their investigation conducted at that time failed to achieve effective hydrolysis at a substrate proportion greater than 10% using simultaneous saccharification and fermentation approaches (SSF), or separate hydrolysis and fermentation (SHF). The authors had thus identified several impediments to high substrate hydrolysis, among which

the cases were :

i- a high concentration of fibrous materials reduces the mass transfer rate ;

ii- a high level of inhibiting substances is produced ;

iii- a high sugar concentration leads to severe inhibition effects of the finished products.

Similarly, Qiu et al. (2017) concluded that increasing initial solid concentrations above 2% w/w reduced significantly the conversion rate.

To circumvent these issues, process optimization though mathematical modeling is the key. Thus, various models have been proposed to describe enzymatic hydrolysis. The simplest approach considers conventional or modified Michaelian kinetics with competitive, non-competitive or uncompetitive inhibition, whereas the most complex modeling strategy may take cellulose polymerization degree or particle size and morphology through a population balance into account (Zhang et al.; 2014; Lebaz et al.; 2015). Alternative mechanistic models sometimes account for chemical or physical phenomena which may affect the kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose, such as concurrent reactions (Tsai et al.; 2014), adsorption equilibria without or with inactivation of adsorbed cellulase (Kadam et al.; 2004; Wang and Feng; 2010; Tervasmäki et al.; 2017), fractal kinetics for heterogeneous reactions (Ye and Berson; 2011), or mixing conditions through mass transfer rate (Kinnarinen et al.; 2012; Wojtusik et al.; 2016). It must be pointed out that the complete mechanism of enzymatic hydrolysis is still unknown and could also depend on the type and purity of the substrate and of the enzymes.

In this work, the goal was, therefore, to hydrolyse and ferment an industrial and readily available sawmill feedstock previously pretreated through an “Organosolv pretreatment” based on an original microwave heating (Alio et al.; 2019). This process presents the simultaneous advantage to produce high quality lignin that can be used in the closed-loop biorefinery concept with potentially high added-value coproducts. So, this study focussed first on glucose concentration and cellulose-to-glucose conversion yield as a function of the operating parameters in a batch enzymatic hydrolysis process ; from these data, a model aimed to predict the glucose concentration, and the cellulose-to-glucose conversion yield could be developed. Then, the feasibility of bioethanol production by fermentation using the obtained enzymatic hydrolysate was studied using the yeast Saccharomyces cerevisiae. Finally, the scale-up from flasks to batch bioreactors of the hydrolysis and fermentation steps for the production of second-generation bioethanol was investigated.

IV.2 Materials and methods

IV.2.1 Feedstocks and reagents

Organosolv pretreated samples of mixed sawdust from four softwood species were used : fir, spruce (Picea abies), Scots pine (Pinus sylvestris), and Douglas fir, respectively. The sawdust

mixture was provided by a local sawmill company (Les Scieries du Centre Marcel Esbelin et Cie), located in Cournon d'Auvergne (France), and was extracted from a monthly feedstock. The initial composition of the sawdust mixture was determined to be 44.3% ± 0.5% glucan (dry wt.), 25.6% ± 0.2% hemicellulose (dry wt.), 26% ± 3% Klason lignin (dry wt.), ash content 0.3% ± 0.2% (dry wt.), and 3.2% ± 0.2% extractives (dry wt.) (Alio et al.; 2019).

The pretreated mixed sawdust was subjected to a microwave-assisted Organosolv pretreatment in which four parameters were studied to optimize the fractionation of the wood, including the cellulose recovery yield and cellulose purity, the lignin recovery yield, and the absence of formation of inhibitors ; these parameters were, namely : (i) the concentration of sulfuric acid (H_2SO_4) as a catalyst ; (ii) the ethanol/water ratio in the extraction solvent ; (iii) the treatment temperature ; (iv) the process time. The optimal conditions determined experimentally on sawdust can be summarized as follows : an ethanol/water ratio of 60 :40 with 0.25% H_2SO_4 for one-hour extraction at 175 °C. These conditions made it possible to remove 50% of the lignin while preserving 82% ± 3% of the initial cellulose with a purity of 71% ± 3%. The composition of the pretreated sawdust mixture was then : 70.6% cellulose, 9.8% hemicellulose, and 19.6% lignin, as determined by strong acid hydrolysis (Alio et al.; 2019).

IV.2.2 Enzymes and other chemicals

The enzymatic hydrolysis was carried out using an enzyme preparation : Cellic® Ctec 2 (Novozymes, Denmark). The activity on filter paper fibers (FPU) was determined as described by Ghose (1987), and the protein content as described by Bradford (1976). Thus, the obtained activity was found to be 189 FPU/mL and the protein content as 77.0 ± 0.3 mg/mL. The chemicals, such as acetate buffer solution (pH 4.8), streptomycin antibiotics and other chemicals (reagent grade) were purchased from Sigma-Aldrich (France).

IV.2.3 Enzymatic hydrolysis

All enzymatic hydrolysis runs were performed according to the NREL standard procedure (Selig; 2008). All experiments were carried out using the pretreated sawdust mixture obtained through the best pretreatment previously described. Depending on the assays, pretreated sawdust mixture solids could be oven-dried (110 °C for 24h) or not. Enzymatic hydrolysis of pretreated mixture was performed in 150 mL Erlenmeyer flasks under batch conditions at 50 °C in a shaker water bath (Julabo SW22, France) with a mixing speed of 180 rpm according to (Mukasekuru et al.; 2018). Hydrolysis was carried out in a 50 mM acetate buffer solution at pH 4.8 using the cocktail of enzyme mentioned above and streptomycin antibiotics were added to prevent contamination. Different biomass loading concentrations were tested : 1.5 %, 3.75 %, 4.5 %, and 5.2 % w/v. The carbohydrate profile in the hydrolysate was determined using HPLC, as described below in section IV.2.6. The enzymatic hydrolysis yield was calculated using the following equation :

$$Cellulose-to-glucose\ conversion\ yield\ (\%) = 100 \times \frac{C_{glucose}\ \left(\frac{g}{L}\right) \times V_{liquid}(L)\ \times\ 0.90}{m_{solids}\ (g)\ \times\ x_{cellulose}} \quad \text{(IV.1)}$$

where $C_{glucose}$ defines the concentration of glucose determined by HPLC (g/L), V_{liquid} represents the volume of the liquid (L), 0.90 is the correction factor for the conversion of cellulose-to-glucose, $x_{cellulose}$ is the mass fraction of cellulose (g cellulose/g solid) m_{solids} is the mass of dry solids (g).

IV.2.4 Fermentation

For the fermentation step, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 was used. The strain was supplied as a lyophilizate, taken in a sterile water and spread onto YM agar-agar (Yeast Medium, Difco 0712-01-8), before incubated 24 hours at 28 °C. The strain was then stored at 4°C and subcultured on a Petri dish 24 hours, before being used in the culture vessels (Bahry et al.; 2017). Then, the fermentation itself was carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks and the hydrolysate obtained after the enzymatic step was used as a culture medium. First, the culture medium (denoted as "unenriched hydrolysate" or UE.H) was considered as the control assay in order to assess the intrinsic potential of the hydrolysate to undergo growth and fermentation. The second culture medium (denoted as "enriched hydrolysate" or E.H) was supplemented with additional elements defined by Kristiansen (1994). The biomass growth was followed by spectrophotometry at 550 nm (Biomate 3S, UV/vis spectrophotometer, Thermo Scientific, France), and the dry matter was determined by gravimetry.

IV.2.5 Enzymatic hydrolysis and fermentation scale-up

For the scale-up experiments, enzymatic hydrolysis was conducted as described in section IV.2.3 using a biomass concentration of 7.52% in a 1000 mL glass bottle with a working volume of 800 mL. Then, the fermentation step was carried out in a 500 mL bioreactor (Infors HT, Multitron 2) with a working volume of 400 mL. The hydrolysate obtained after the enzymatic hydrolysis was completed as described in section IV.2.4. Only (E.H) and was used as the culture medium.

IV.2.6 Sugar, ethanol and inhibitors quantification

In order to monitor the evolution of the carbohydrate concentrations during the enzymatic hydrolysis and during fermentation, samples of 1 mL were taken at specific time intervals. In the case of enzymatic hydrolysis, enzymes were first deactivated in all samples at 100 °C for 10 min. Prior to analysis, each sample was deproteinized to prevent clogging of chromatography column. For this purpose, 125 μL of barium hydroxide solution ($Ba(OH)_2$; 0.3 M) and 125 μL of zinc sulfate solution ($ZnSO_4$, $7H_2O$; 5% w/v) were added to the samples. After centrifugation ((Thermo scientific, France) for 5 minutes at 10,000 g, the supernatant was filtered using a 0.2 μm cellulose acetate filter (Chromafil, Germany). The concentrations of glucose, cellobiose, xylose, ethanol, and by-products (formic acid, levulenic acid, and acetic acid) were measured

using a high-performance liquid chromatography (HPLC) device (1260 Infinity Quaternary LC system, Agilent Technology, USA). This was equipped with two ionic exclusion columns in series (Rezex ROA 300x7.8 mm, Phenomenex, USA). The mobile phase was a solution of 5 mM sulfuric acid at 0.7 mL/min flowrate. Products detection was done using a refractometer (HP 1100 series, Agilent Technologies, USA).

IV.2.7 Data analysis and number of samples replicate

All the results reported for batch hydrolysis and fermentation are the mean values of at least two replicates based on two batches of repeated experiments under the same conditions. Three samples were taken for each time point. The mean and standard deviation were calculated by Excel© Sheets version 1902 (Microsoft© Office package).

IV.2.8 Enzymatic hydrolysis kinetic modeling

As described in section IV.1, various models had been proposed in the literature to describe this process. A rapid analysis of preliminary data had shown that the rate of glucose production could not be fitted by a LineweaverBurk plot, which suggested a more complex mechanism than classical or modified Michaelian kinetics as a function of substrate content. Similarly, glucose production rate increased with substrate loading, so that the effect of enzyme mass transfer resistance never seemed to become predominant, despite the increase in dispersion viscosity. Actually, the initial reaction rate appeared to be nearly proportional to the initial substrate loading, while reaction rate decreased over time when substrate consumption proceeded, indicating a limitation by enzyme availability. Among the possible mechanistic models able to simulate the enzymatic hydrolysis of the pretreated sawdust mixture with the enzymatic cocktail, an approach similar to that proposed by Kadam et al. (2004), considering enzyme adsorption, was adopted. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials is a heterogeneous reaction where the adsorption of enzymes is one of the key steps in the overall reaction mechanism. Thus, hydrolysis can be seen as a succession of two rate-limited reaction steps schematized in the following equation : a heterogeneous reaction involving endoglucanases (EG) and cellobiohydrolases (CBH) to produce cellobiose, and then a homogeneous reaction where cellobiose is transformed into glucose by β-glucosidases (BGL), as follows

$$Cellulose\ (EG/CBH) \xrightarrow{r_1} Cellobiose\ (BGL) \xrightarrow{r_2} Glucose \tag{IV.2}$$

The transformation speed of the cellulose r_1 by the pair EG / CBH considering the (competitive) inhibition effect by the products (cellobiose and glucose) is given by :

$$r_1 = \frac{(k_{1r} \times E_{1b} \times R_S \times S)}{\left(1 + \frac{C_C}{K_{1IC}} + \frac{C_G}{K_{1IG}}\right)} \tag{IV.3}$$

Then, the rate of transformation of cellobiose into glucose r_2 by BGL is given by the following Michaelian kinetics :

$$r_2 = \frac{k_{2r} \times E_2 \times C_c}{K_{2M}\left(1 + \frac{C_G}{K_{2IC}}\right) + C_C} \tag{IV.4}$$

where S, C_c, C_G, E_{1b} and E_2 represent the respective concentrations of substrate, cellobiose and glucose and of the EG/BGL and BGL enzyme species (g.kg^{-1}), the subscript b corresponding to bound enzymes. In these equations, K_{iIG}, K_{1IC} represent the inhibition constants of glucose in reaction i and of cellobiose (g.kg^{-1}), respectively ; K_{2M} designates the enzyme Michaelis constant in r_2 (g.kg^{-1}), and finally, k_{1r} and k_{2r} are the respective kinetic constant of r_1 and r_2, and R_S the substrate reactivity. Adsorption was modelled using a Langmuir isotherm, which assumes that equilibrium is rapidly reached and can be described by

$$E_{1b} = \frac{E_{1max} \times k_{1ad} \times E_1 \times S}{1 + k_{1ad} \times E_1} \tag{IV.5}$$

where the amount of free enzyme E_1 is related to the amount of bound enzyme E_{1b} by the enzyme conservation law and two additional parameters : K_{1ad} the dissociation constant for the enzyme/substrate complex, and E1max the maximum mass of enzyme that can adsorb onto cellulose, both expressed in g enzyme/g cellulose. Eq. IV.5 also expresses the relationship between E_{1b} and substrate concentration S.

From this model, a set of differential equations vs. time was derived, which was solved using a first-order Euler forward algorithm. The equations were finally coded and solved using the MATLAB programming environment. Langmuir adsorption parameters were derived from Kadam et al. (2004), while the kinetic parameters were deduced by fitting the model with experimental data.

IV.3 Results and discussion

IV.3.1 Enzymatic hydrolysis

IV.3.1.1 Effect of size reduction on the dried substrate

Prior to the preliminary assays of enzymatic hydrolysis, pretreated sawdust mixture was oven-dried (110 °C for 24h) for dosage purpose (Alio et al.; 2019). Then, this was subjected to enzymatic hydrolysis, conducted at 1.5% (w/v) substrate loading, with an enzyme content of 50 FPU/g of dry pretreated sawdust mixture for two different particle sizes. A first fraction of the solids was crushed using a domestic blender to reach an average particles size passing through 0.5 mm sieve (IG), while the other one was kept intact with an average size larger than 0.5 mm (SG). Thus, the hydrolysis of SG resulted in a glucose concentration about 1.6 ± 0.3 g/L, while the hydrolysis of IG produced approximately 3.1 ± 0.1 g/L glucose in the final hydrolysate. When the cellulose-to-glucose conversion yield was calculated (Fig. IV.1) , it was found that only 12.4% ± 0.7% of the cellulose present in the SG pretreated sawdust mixture was converted to glucose within 8 days of incubation. Reducing the substrate particle

size to a smaller granulometry (IG) doubled cellulose-to-glucose conversion yield, which reached approximately 24% ± 1%. Other studies had already investigated the effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose (Dasari and Berson; 2007; Sangseethong et al.; 1998; Yeh et al.; 2010). According to Sangseethong et al. (1998), reducing particle size from 0.10 to 0.02 mm at 0.1% (w/v) substrate proportion almost doubled the saccharification rate of cellulose (Avicel). Nevertheless, with the same size reduction, only 50% increase in the saccharification rate was observed at 2% (w/v) substrate concentration according to Yeh et al. (2010). Finally, Zeng et al. (2007) also reported that reduction of size from 425–710 to 53–75 μm raised glucose production rate from 0.1 to 0.18 g/L/h. In agreement with the literature, experimental results obtained in this study highlight that a reduction in particle size significantly enhances the hydrolysis rate of cellulose. However, the grinding process may be costly because of its important power requirements that counterbalance its beneficial effects on cellulose-to-glucose conversion yield Shastri et al. (2014). These authors have determined the evolution of the cost of Miscanthus and switchgrass size reduction as a function of output particle size using a hammer mill for the following particle sizes : 1, 2, 4, 6, 8, 12.7, 16, 25.4 mm. According to this study (Table IV.1), the costs were dramatically increase when particle size was reduced below 2 mm. However, for both the Miscanthus and the switchgrass, the optimal particle size was ranged between 4 and 6 mm, and the corresponding total cost (grinding, storage and transportation) were about $55 and $61 per ton for Miscanthus and switchgrass, respectively.

Table IV.1: Evolution of size reduction costs of Miscanthus and switchgrass as a function of the output particle size using a hammer mill (data extracted from Shastri et al. (2014)). .

Particle size (mm)	Miscanthus grinding cost ($/10^3 kg)	Switchgrass grinding cost ($/10^3 kg)
1	55.20	54.74
2	24.75	30.77
4	15.72	15.67
6	12.70	11.41
8	10.03	9.58
12.7	7.71	7.73
16	6.68	5.90
25.4	5.02	4.28

IV.3.1.2 Effect of substrate humidity

Fig. IV.1 also displays the evolution of the cellulose-to-glucose conversion yield as a function of time for two different substrate humidity values : oven-dried pretreated substrate, and wet pretreated substrate. Both runs were performed on 0.5–1 mm pretreated substrate particule size to cut the cost of the grinding process, at 1.5% (w/v) substrate concentration and an enzyme loading of 50 FPU/g of pretreated substrate. Regarding these results for both cases, it can be noticed that the enzymatic hydrolysis was strongly affected by the humidity level. So, a low conversion rate was observed with the dried pretreated substrate with a maximum conversion

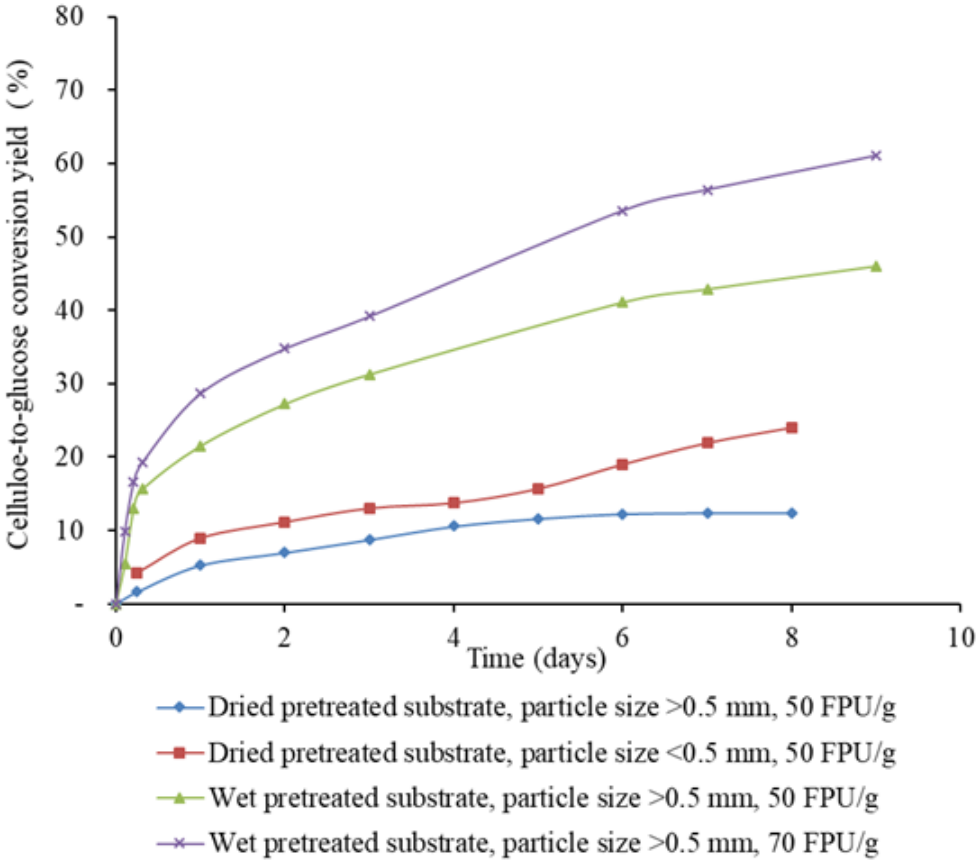


FIGURE IV.1: Evolution of cellulose-to-glucose conversion vs. time at 1.5% (w/v) initial substrate content : effects of drying (wet vs. dry substrate), particle size (>0.5mm vs. <0.5 mm) and enzyme loadings (50 vs. 70 FPU/g).

yield reached after 8 days of 12.4 ± 0.5% , while a value of 56% ± 2% was reached for the wet pretreated substrate in the same period. There is no doubt that this difference was due to the low digestibility of the dried substrate, linked itself to a structure modification of the substrate as a direct impact of the drying process. According to Kang et al. (2018), the drying step of NaOH pretreated Eucalyptus samples caused a decrease in the volume and the surface area of the porosity of wood of about 45% of the initial value. So, the pore volume and surface area of dried biomass substrates should not provide sufficient access to the enzymes for adsorption onto the cell surfaces, thus significantly slowing down the enzymatic hydrolysis of the cellulose. Moreover, these authors also explained the structure modification as a result of a significant pore collapse in the cellulose fibers during the oven-drying procedure, based on the low adsorption capacity of dried pretreated Eucalyptus samples.

Bhagia et al. (2018) also reported that drying possibly caused pore collapse and thereby impaired cellulose accessibility. In their investigations, Huang et al. (2010) advocated, however, that the changes in the chemical composition might also be an alternative reason, as the removal of lignin and hemicellulose had also a significant effect on the surface area and the pore

size distribution. Another possible reason in the present study could be linked to the Organosolv pretreatment that did not significantly delignify the raw sawdust material, as a significant fraction of the lignin remained in the resulting pretreated substrate (39% ± 1% w/w of the raw feedstocks lignin content, which represents 20% ± 2% w/w of the pretreated substrate). High lignin content is, indeed, known to hinder enzymatic hydrolysis through the nonproductive binding of cellulase enzymes. Likewise, as a non-cellulose component, hemicellulose is generally considered as a physical hindrance in enzymatic hydrolysis of cellulose, and prevents the access of cellulose from cellulose surface Qiu et al. (2017).

Finally, it emerges from experimental data that there is no need to dry the pretreated substrate, which saves energy and enhances hydrolysis rate at the same time, and that hydrolysis must be carried out rapidly after pretreatment to prevent natural drying.

IV.3.1.3 Effect of enzyme loading on the wet substrate

The wet pretreated sawdust mixture was hydrolyzed at both 50 and 70 FPU/g enzyme content under the same conditions as applied before, i.e. 1.5% substrate loading and particle size between 0.5 and 1 mm. As shown in Fig. IV.1, it is apparent that increasing enzyme loading leads to an increase in sugar concentration and cellulose-to-glucose conversion rate. Thus, the pretreated sawdust with the higher enzyme loading demonstrated a higher hydrolysability which reached nearly 68% of the available cellulose. Hydrolysis using 70 FPU/g enzyme loading also yielded a greater glucose concentration that reached 7.8 ± 0.2 g/L in the hydrolysate after 10 days, while 5.7 ± 0.5g/L and only about 50% conversion yield were obtained at 50 FPU/g. Thus, 50 FPU/g substrate induced a 28% reduction in enzyme loading in comparison to the maximum value, which reduced the final glucose amount by about 27% (from 8 to 6 g/L), i.e. approximately the same value. The same conclusions were reported by Zhang et al. (2009) when conducting an enzymatic hydrolysis on pretreated hardwood substrates with three different enzyme charges (3, 10 and 20 FPU/g). Moreover, in another study by Bhagia et al. (2018), 1% glucan loading (Avicel, 97% cellulose and 3% xylan) was enzymatically hydrolyzed using Accelerase® 1500 at two different enzymes loadings, 5 and 30 mg of enzyme/100 mL of solvent, designated as low and high cellulase loadings, respectively ; as a result, these authors observed that the kinetic curves displayed a cellulose conversion yield of 60% for up to 17 days of enzymatic hydrolysis at low enzyme loading, while the conversion yield reached 97% for up to 9 days at high enzyme loading. Similar results were also reported in other studies conducted in quite identical experimental conditions of the present work (Stenberg et al.; 2000; Zhang et al.; 2009). As a conclusion, enzymatic hydrolysis remains strongly dependent on enzyme content, even though 1.5% (w/v) substrate loading used is the lowest value used in this work.

IV.3.1.4 Effect of wet substrate loading

Fig. IV.2 depicts the evolutions of glucose concentration and hydrolysis yield as a function of time for four different wet pretreated substrate loadings (1.5%, 3.75%, 4.5%, and 5.2% w/v) with a particle size between 0.5 and 1 mm, at 50 FPU/g. Basically, it can be noted that, in general, the higher the amount of hydrolyzed substrate, the higher the amount of glucose produced, as expected. However, a surprising result was that the conversion yield first increased rapidly when the substrate loading was increased from 1.5% to 3.75%, and then became nearly constant, independent from substrate loading (Fig. IV.2). This means that the hydrolysis rate was nearly proportional to the initial substrate loading, even though it decreased over time when substrate consumption proceeded. Thus, a cellulose-to-glucose conversion yield about 77 ± 3% could be reached when wet substrate loading was between 3.75% and 5.2% (w/v). As the conversion yield was not significantly different for 3.75%, 4.5%, and 5.2% (w/v) substrate proportion, the consequence is that the glucose concentration increased nearly proportionally to the substrate content up to 32 ± 1 g/L at 5.2% (w/v) substrate loading, corresponding to a conversion yield of 80% ± 2% after 12 days of hydrolysis.

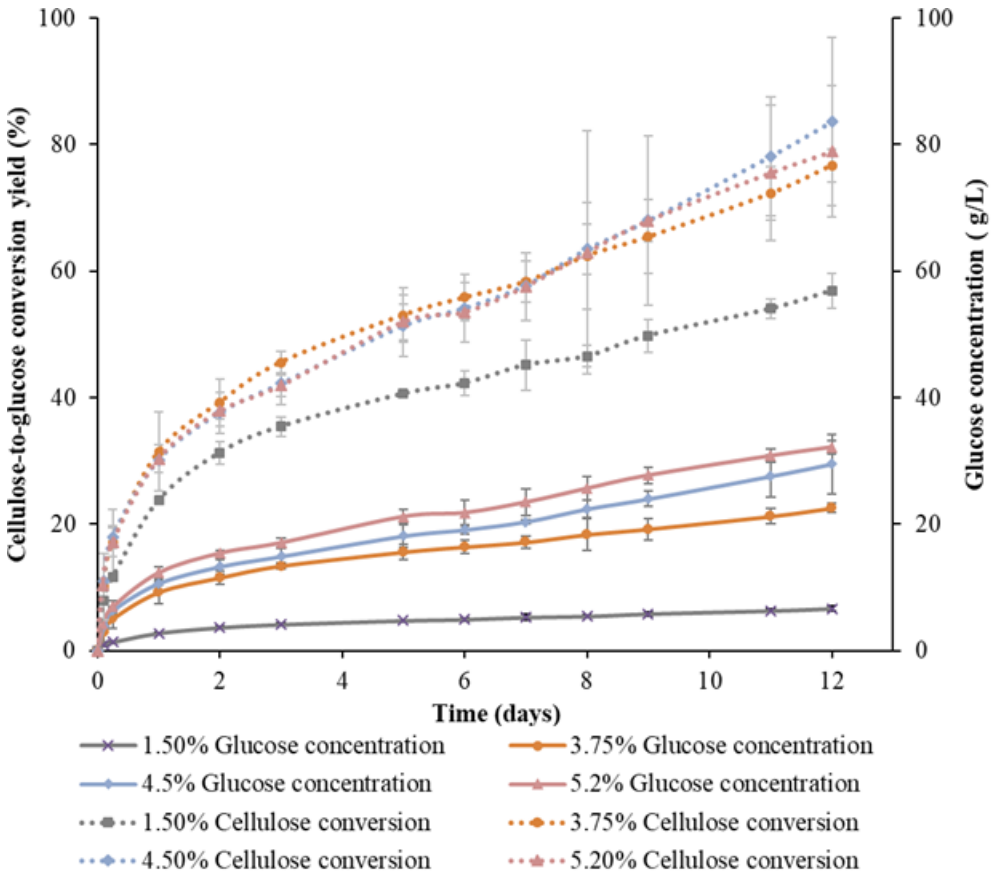


FIGURE IV.2: Analysis of enzymatic hydrolysis of pretreated sawdust at four different substrate loadings (1.5%, 3.75%, 4.5%, and 5.2% w/v), monitoring the glucose concentration and the cellulose-to-glucose conversion yield.

Similar outcomes on the evolution of glucose concentration had been already reported by several studies (Stenberg et al.; 2000; Zhang et al.; 2009). For example, Zhang et al. (2009)

investigated the effect of substrate loading during enzymatic hydrolysis using a pretreated wheat straw by phosphoric acid and hydrogen peroxide. Four substrate loadings (2, 10, 15, and 20%) were tested, and it was pointed out that the highest substrate consistency led to the highest glucose concentration in the final hydrolysate. However, the cellulose-to-glucose conversion yield decreased slightly when the substrate loading increased.

Finally, contrary to expectations which predicted an increase in glucose concentration coupled to a decrease in yield when substrate content was increased, it was found that the lowest substrate loading investigated, 1.5% (w/v), lead simultaneously to the lowest conversion yield (57% ± 3%) and the lowest concentration of glucose (6.7 ± 0.3g/L), whereas the best results were achieved for the highest proportion of substrate (5.2% w/v) in terms of yield and glucose content. Thus, by increasing pretreated substrate loading, higher concentrations of fermentable sugars are available and then, higher ethanol concentration can be achieved. Due to mixing issues resulting from the high viscosity of the cellulose suspension, experiments in 150 mL Erlenmeyer flasks had to be limited to 5.2% (w/v) substrate loading, but a higher concentration will be tested in the scale-up assays in section IV.3.4, as better mixing condition could be achieved.

IV.3.2 Fermentation tests in flasks

To produce bioethanol, the upstream enzymatic hydrolysis process must provide, as much as possible, a hydrolysate highly concentrated in glucose, accompanied by minor quantities of other hydrolyzed components (hemicellulose, inhibitors, etc.). The hydrolysates obtained from the enzymatic hydrolysis of 3.75% (w/v) substrate loading present a satisfactory glucose concentration to critically investigate the capacity of the yeast to develop fermentation (24.7 g/L glucose). As already stated, (UE.H) corresponds to the medium without supplementation, whereas the culture medium is supplemented by the minerals and vitamins nutrients as described by Kristiansen (1994) in (E.H), both being prepared with an identical concentration of pure glucose. Fig. IV.3 illustrates the evolution of glucose, ethanol and dry cell weight concentrations for the two hydrolysates tested (UE.H and E.H). Regarding the results, the sugars undergo ethanol fermentation in both cases, but the difference lies in the rates of glucose and of ethanol production, and consequently, in the concentration values compared at the same time In the Kristiansen's medium, all the sugars were consumed after 9 hours and the produced ethanol reached approximately 9.5 ± 0.4 g/L (data not shown). In the case of the E.H assay, the maximum concentration of ethanol was found to be 10.1 ± 0.7 g/L after 24 hrs., which constituted 72% of the theoretical glucose-to-ethanol conversion yield (0.51 g ethanol per gram of glucose). In parallel, the maximum concentration of ethanol was only 3.1 ± 0.2 g/L at the same time for the UE.H assay. The latter concentration represented only 22 ± 1% of the theoretical glucose-to-ethanol conversion yield. This demonstrates the need to enrich the hydrolysates with components necessary for the growth of yeast, such as the source of phosphorus (KH_2PO_4), and nitrogen $(NH_4)_2SO_4$, as well as various salts and vitamins (Kristiansen; 1994). Table IV.2 summarizes the kinetic parameters calculated from the fermentation inputs and outputs. Finally, the fermentation of the glucosidic

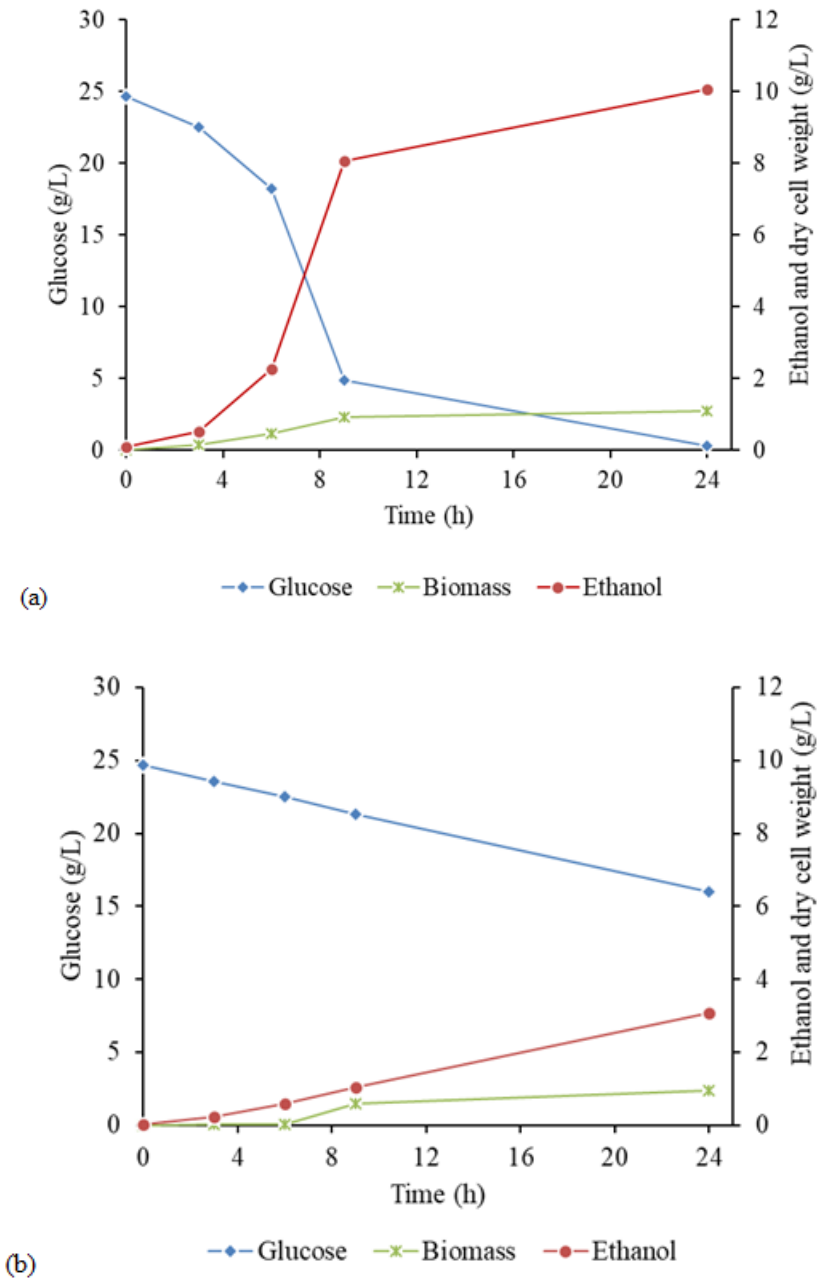


FIGURE IV.3: Evolution of ethanol, biomass and glucose concentrations in the submerged fermentation broth in flasks (a) : enriched hydrolysate (E.H), and (b) : unenriched hydrolysate (UE.H).

hydrolysate by a strain of Saccharomyces cerevisiae led us to reach an alcoholic fermentation yield close to 80% of the theoretical yield, which seems consistent with the absence of inhibiting compounds produced during the pretreatment and hydrolysis steps.

IV.3.3 Scale-up of the processes : enzymatic hydrolysis and fermentation

The enzymatic hydrolysis scale-up was carried out at 7.5% (w/v) pretreated sawdust mixture substrate in a 800 mL working volume under the same conditions applied to the other pretreated

Table IV.2: Comparison of kinetic data obtained from the different fermentation trials.

Kinetic parameters	Kristiansen medium (Erlenmeyer) [a]	Unenriched hydrolysate (Erlenmeyer)[a]	Enriched hydrolysate (Erlenmeyer)[a]	Enriched hydrolysate (Bioreactor)[b]
Total culture time (h)	24	24	24	24
Sugars consumption yield (%)	100 ± 1	45.4 ± 1	99 ± 2	99 ± 2
Cell concentration ΔX (g/L)	5.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1	2.75 ± 0.2	3.8 ± 0.5
Ethanol concentration ΔE (g/L)	8.4 ± 0.5	3.1 ± 0.2	10.1 ± 0.7	16 ± 2
YE-S : yield (%)	35.0 ± 0.3	35.0 ± 0.1	39.0 ± 0.5	41.0 ± 0.1
Max production rate (g EtOH/L/h)	0.35 ± 0.09	0.12 ± 0.09	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1

[a] This experiment was realized as a first positive trial before up-scaling to the bioreactor.
[b] Standard deviation is based on experiments carried out in duplicate.

substrate loadings according to the solids loading range proposed by Stenberg et al. (2000) and Wingren et al. (2003). In these assays, the final glucose concentration was measured at about 34.5 g/L, which represents a cellulose-to-glucose conversion yield of 59 ± 2% for up to 12 days (data not shown). This value is lower than in 150 mL flasks, which can probably be explained by the high viscosity of the 7.5% (w/v) substrate suspension. The fermentation step was then performed in a 500 mL bioreactor using the obtained hydrolysate enriched with vitamins and minerals. The fermentation assays were carried out for 24 hrs. ; the produced ethanol and the decrease in glucose contents were monitored during the fermentation. According to Fig. IV.4, approximately all the glucose was consumed after only 8 h. The produced ethanol in fermentation broth reached nearly 16 ± 2 g/L at the same time, which represents almost 80% of the theoretical glucose-to-ethanol conversion yield.

According to the information provided by Table IV.2, comparison of the control-based fermentation and the enriched hydrolysate fermented in bioreactor demonstrates the interest to use a bioreactor, in terms of yields and rates. Moreover, the high substrate proportion during enzymatic hydrolysis not only reduces the capital cost for installation of hydrolysis vessel, but it also more significantly provides a concentrated glucose stream for subsequent fermentation which will lead to important savings in the distillation cost Zhang et al. (2009).

IV.3.4 Model for enzymatic hydrolysis

From the previous sections, it emerges that enzymatic hydrolysis is the bottleneck of the process. Thus, modelling must focus on this step. Using the adsorption-reaction model developed

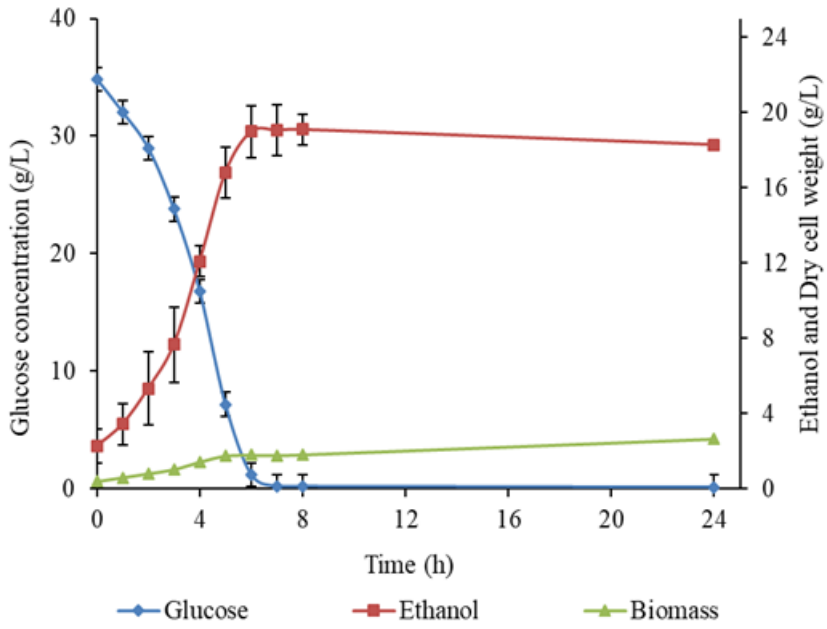


FIGURE IV.4: Evolution of glucose, ethanol and yeast cells concentrations during fermentation scale-up in the bioreactor

in section IV.3.4 and inspired by (Kadam et al.; 2004) to fit enzymatic experimental data, adjusted model parameters were derived from the data monitored for the enzymatic hydrolysis performed at 3.75% (w/v) substrate loading in 150 mL Erlenmeyer flasks, as described in section IV.3.1 . The estimated value for maximum glucose concentration was found to be 19.3 g/L versus 21.4 ± 0.2 g/L derived experimentally for 3.75% (w/v) substrate. Fig. IV.5 displays the comparison between calculated and experimental results after using the adjusted parameters in the model (k_{1r} = 3.61 g/(mg.h), and k_{2r} = 11.5 g/(mg.h)), not only for 3.75% substrate loading, but also for 4.5% and 5.2% (w/v). The plot of glucose concentration as a function of time shows that the model correctly fits glucose production for the three concentrations until day 8, whereas glucose production is underestimated for longer times, especially when loading is increased. However, the model was not able to predict correctly the scale-up in a 1000 mL bottle : it overestimated about 38.2 g/L glucose production the experimental value at day 12, while it underestimated experimental values at lower loading in Fig. IV.5. This result agrees with the decrease in conversion yield and with the effect of suspension viscosity at high substrate loading that slows down mass transfer phenomena, as Kadam's model assumes a Langmuir equilibrium model for enzyme adsorption, accounting only for the kinetics of chemical steps. This highlights that more complex models are probably required and that the respective influences of mixing conditions and dispersion rheology must be studied for scale-up purpose.

IV.4 Conclusion

The feasibility of lignocellulosic bioethanol production using a sawmill mixed feedstock of softwood species was assessed. Enzymatic hydrolysis, applied to an undried microwave-assisted

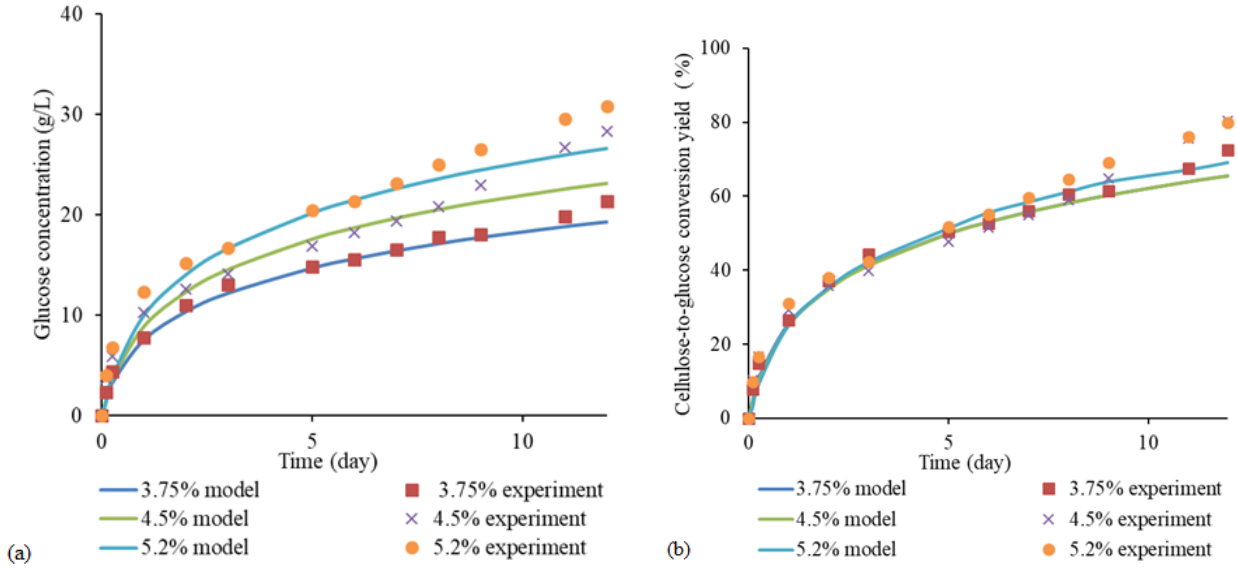


FIGURE IV.5: Kinetic model validation based on enzymatic hydrolysis conducted in Erlenmeyer flasks for 3.75, 4.5, and 5.2% (w/v) pretreated substrate loading : (a) the glucose concentration ; (b) the cellulose-to-glucose conversion yield.

water/ethanol Organosolv pretreated substrate (71% w/w cellulose) with particle size higher than 0.5 mm, reached 80% saccharification yield with up to 5.2% (w/v) substrate loading. Higher loading decreased this yield, but higher ethanol concentration could be achieved from subsequent fermentation using Saccharomyces cerevisiae, e.g. 16 g/L when substrate loading was 7.5% (w/v). As an outcome, this process which tends to a closed-loop biorefinery, is promising for regions where only mixed softwood feedstock is available.

IV.5 CRediT authorship contribution statement

Maarouf Abdou Alio : Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft. **OanaCristina Tugui** : Investigation, Formal analysis. **Lacramioara Rusu** : Supervision. **Agnès Pons** : Supervision, Conceptualization, Project administration, Writing - review and editing. **Christophe Vial** : Software, Methodology, Conceptualization, Supervision, Writing - review and editing, Project administration.

IV.6 Declaration of Competing

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

IV.7 Acknowledgments

This work was funded by Auvergne Rhône-Alpes Regional Council, and the European Regional Development Fund (FEDER/ERDF) to promote the valorization of local feedstocks (wood-wastes) on a regional scale.

IV.8 Experience complémentaires

Bibliographie

Akgul, M. and Kirci, H. (2009). An environmentally friendly organosolv (ethanol-water) pulping of poplar wood, *Journal of Environmental Biology* **30**(5) : 735–740.

Alio, M. A., Tugui, O.-C., Vial, C. and Pons, A. (2019). Microwave-assisted Organosolv pretreatment of a sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery, *Bioresource Technology* **276** : 170–176.

Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., Taha, S. and Vial, C. (2017). Valorization of carob waste : Definition of a second-generation bioethanol production process, *Bioresource Technology* **235** : 25–34.

Bhagia, S., Dhir, R., Kumar, R. and Wyman, C. E. (2018). Deactivation of Cellulase at the Air-Liquid Interface Is the Main Cause of Incomplete Cellulose Conversion at Low Enzyme Loadings, *Scientific Reports* **8**(1) : 1–12.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**(1) : 248–254.

Bryngemark, E. (2019). Second generation biofuels and the competition for forest raw materials : a partial equilibrium analysis of sweden., *Forest Policy and Economics* **109** : 102022.

Chovau, S., Degrauwe, D. and Van der Bruggen, B. (2013). Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **26** : 307–321.

Dasari, R. K. and Berson, R. E. (2007). The Effect of Particle Size on Hydrolysis Reaction Rates and Rheological Properties in Cellulosic Slurries, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 289–299.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities, *Pure and Applied Chemistry* **59**(2) : 257–268.

Huang, R., Su, R., Qi, W. and He, Z. (2010). Understanding the key factors for enzymatic conversion of pretreated lignocellulose by partial least square analysis, *Biotechnology Progress* **26**(2) : 384–392.

Kadam, K. L., Rydholm, E. C. and McMillan, J. D. (2004). Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, *Biotechnology Progress* **20**(3) : 698–705.

Kang, K.-Y., Hwang, K.-R., Park, J.-Y., Lee, J.-P., Kim, J.-S. and Lee, J.-S. (2018). Critical Point Drying : An Effective Drying Method for Direct Measurement of the Surface Area of a Pretreated Cellulosic Biomass, *Polymers* **10**(6) : 676.

Kinnarinen, T., Shakhanova, M., Hietanen, E., Salmimies, R., Häkkinen, A. and Louhi-Kultanen, M. (2012). Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of cardboard waste : Saccharification yield and subsequent separation of the solid residue using a pressure filter, *Bioresource Technology* **110** : 405–411.

Kristiansen, B. B. (1994). *Integrated design of a fermentation plant : the production of baker's yeast*, Weinheim ; New York : VCH.

Lebaz, N., Cockx, A., Spérandio, M. and Morchain, J. (2015). Population balance approach for the modelling of enzymatic hydrolysis of cellulose, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **93**(2) : 276–284. _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cjce.22088.

Mukasekuru, M. R., Hu, J., Zhao, X., Sun, F. F., Pascal, K., Ren, H. and Zhang, J. (2018). Enhanced high-solids fed-batch enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse with accessory enzymes and additives at low cellulase loading, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **6**(10) : 12787–12796.

Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S. and Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol : Part I : Pretreatment technologies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **72** : 178–190.

Qiu, J., Ma, L., Shen, F., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S., Zhang, J., Zeng, Y. and Hu, Y. (2017). Pretreating wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide for enzymatic saccharification and ethanol production at high solid loading, *Bioresource Technology* **238** : 174–181.

Sangseethong, K., Meuniers-Goddik, L., Tantasucharit, U., Liaw, E. and Penner, M. H. (1998). Rationale for particle size effect on rates of enzymatic saccharification of microcrystalline cellulose, *Journal of Food Biochemistry* **22**(4) : 321–330.

Sarks, C., Jin, M., Sato, T. K., Balan, V. and Dale, B. E. (2014). Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle, *Biotechnology for Biofuels* **7**(1) : 73.

Selig, M. (2008). *Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass laboratory analytical procedure (LAP) : issue date, 3/21/2008 /*, National Renewable Energy Laboratory,, Golden, Colo. :.

Shastri, Y. N., Miao, Z., Rodríguez, L. F., Grift, T. E., Hansen, A. C. and Ting, K. C. (2014). Determining optimal size reduction and densification for biomass feedstock using the BioFeed optimization model, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **8**(3) : 423–437.

Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M. and Zacchi, G. (2000). Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production, *Biotechnology and Bioengineering* **68**(2) : 204–210.

Tervasmäki, P., Sotaniemi, V., Kangas, J., Taskila, S., Ojamo, H. and Tanskanen, J. (2017). A discretized model for enzymatic hydrolysis of cellulose in a fed-batch process, *Bioresource Technology* **227** : 112–124.

Tsai, C.-T., Morales-Rodriguez, R., Sin, G. and Meyer, A. S. (2014). A Dynamic Model for Cellulosic Biomass Hydrolysis : a Comprehensive Analysis and Validation of Hydrolysis and Product Inhibition Mechanisms, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **172**(6) : 2815–2837.

Wang, Z. and Feng, H. (2010). Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions, *Bioresource Technology* **101**(20) : 7995–8000.

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, *Biotechnology Progress* **19**(4) : 1109–1117.

Wojtusik, M., Zurita, M., Villar, J. C., Ladero, M. and Garcia-Ochoa, F. (2016). Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass : Effect of mass transfer rate, *Bioresource Technology* **216** : 28–35.

Ye, Z. and Berson, R. E. (2011). Kinetic modeling of cellulose hydrolysis with first order inactivation of adsorbed cellulase, *Bioresource Technology* **102**(24) : 11194–11199.

Yeh, A.-I., Huang, Y.-C. and Chen, S. H. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose, *Carbohydrate Polymers* **79**(1) : 192–199.

Zeng, M., Mosier, N. S., Huang, C.-P., Sherman, D. M. and Ladisch, M. R. (2007). Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering* **97**(2) : 265–278.

Zhang, X., Qin, W., Paice, M. G. and Saddler, J. N. (2009). High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates, *Bioresource Technology* **100**(23) : 5890–5897.

Zhang, Y., Xu, B. and Zhou, W. (2014). On a novel mechanistic model for simultaneous enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose considering morphology, *Biotechnology and Bioengineering* **111**(9) : 1767–1781. _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.25244.

Zhao, X., Cheng, K. and Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**(5) : 815–827.

Bilan

L'objectif de ce chapitre était donc d'hydrolyser une matière première de scierie industrielle préalablement prétraitée (71 % p/p cellulose) par un solvant eau/éthanol selon un "prétraitement Organosolv" basé sur un chauffage original par micro-ondes, puis de fermenter les sucres obtenus. Les résultats de ce chapitre appellent les observations suivantes :

— L'hydrolyse enzymatique, appliquée à un substrat prétraité avec une granulométrie supérieure à 0,5 mm, a atteint 80 % de rendement de saccharification avec jusqu'à 5,2 % (p/v) de charge du substrat.
— Une charge de substrat plus élevée diminue considérablement ce rendement.
— En ce qui concerne la fermentation alcoolique, une concentration en éthanol plus élevée de 16 g/L a été obtenue en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*, lorsque la charge de substrat est de 7,5 % (p/v).

Les résultats de ce chapitre apportent des informations pertinentes pour la compréhension du procédé d'hydrolyse enzymatique et de fermentation alcoolique. Ainsi, les données récoltées (rendements et compositions), ainsi que celles obtenues précédemment sur le procédé de prétraitement Organosolv étudié au chapitre III seront utilisées comme point de départ pour développer à l'aide d'un logiciel de simulation un modèle de simulation de bioraffinerie lignocellulosique de production de bioéthanol basée sur le procédé de prétraitement Organosolv. Cette étude sera développée dans le chapitre suivant.

Chapitre V

Modélisation et simulation de bioraffinerie

« Seulement ceux qui prendront le risque d'aller trop loin découvriront jusqu'où on peut aller »

Thomas Stearns Eliot

Sommaire

V.1 Introduction **145**

V.2 Materials and methods **148**

V.2.1 Modeling and simulation 148

V.2.2 Process model overview 148

V.2.2.1 Part 0 : feedstock handling 150

V.2.2.2 Part 1 : Organosolv pretreatment 150

V.2.2.3 Part 2 : Lignin and solvent recovery 150

V.2.2.4 Part 3 : enzymatic hydrolysis and fermentation 153

V.2.2.5 Part 4 : Ethanol recovery 153

V.2.2.6 Parts 5, 6 and 7 : Solid recovery, wastewater treatment, combustion and utilities 154

V.2.3 Key technical parameters 155

V.2.4 Heat integration 157

V.3 Results and discussion **157**

V.3.1 Ethanol production mass balance 157

V.3.2 Water mass balance 160

V.3.3 Energy balance 161

V.3.4 Pinch Analysis and further heat integration 161

V.3.5 Effect of co-product markets in production cost 164

V.4 Conclusion **164**

V.5 CRediT authorship contribution statement **164**

V.6 Declaration of Competing **164**
V.7 Acknowledgments **165**
Bibliographie **165**

Préambule

Une bioraffinerie est une installation qui intègre des procédés et des équipements de conversion de la biomasse pour produire des carburants, de l'énergie et des produits chimiques à moyenne et haute valeur ajoutée à partir de la biomasse. La bioraffinerie est analogue dans son principe à la raffinerie de pétrole actuelle, qui rationalise l'utilisation de la matière première en produisant une large gamme de carburants, de coproduits et de dérivés. La bioraffinerie doit donc tirer profit des différents constituants de la biomasse et de leurs intermédiaires de dégradation afin de maximiser la valeur ajoutée à la matière première.

Cette partie de notre travail vise à modéliser et simuler le concept de bioraffinerie basée sur la conversion de sciure de bois multi-espèces en bioéthanol.

De ce fait, le travail réalisé dans ce chapitre a nécessité la collecte de toutes les informations et données obtenues aux chapitres III et IV. Les conditions opératoires du prétraitement Organosolv considérées correspondent à celles nous ayant permis d'obtenir des meilleurs résultats en matière de pureté et rendement en cellulose mais également en matière de rendement de délignification (60 /40 éthanol-eau, 175 °C, 0,25 % H_2SO_4 et 60 min). Le prétraitement du substrat initial est suivi d'une étape d'hydrolyse enzymatique pour transformer cellulose et hémicelluloses en sucres. Les sucres ont ensuite été fermentés en réalisant des cultures de levure. Les conditions opératoires de ces deux étapes sont choisies sur la base des résultats obtenus expérimentalement comme mentionné précédemment.

Ce chapitre V sera soumis prochainement à la revue Bioressoure Technology.

Modeling and simulation of a sawdust mixture-based biorefinery plant producing bioethanol

M. ABDOU ALIO[a], A. MARCATI[a], A. PONS[a], Ch. VIAL[a, 1]

[a] Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut Pascal ; F-63000, Clermont 35 Ferrand, France

Abstract

The design, modeling and simulation of an integrated biorefinery plant assumed to convert different forestry assortments such as sawdust or shavings (sawmill waste) into bioethanol as the main product, lignin as the most valuable by-product, pellets as solid residue, and other valuable byproducts, was carried out. The proposed cellulosic ethanol biorefinery plant was simulated with ProSimPlus. The model was based on an experimental database involving the physicochemical characterization of the raw material, an Organosolv pretreatment as the deconstruction method, and enzymatic analysis. The investigated plant size processed 70,088 tons of biomass/year, with a production capacity of 12,000 tons ethanol/year. Ethanol productivity reached 349 L/ton of dry feedstock. Considering water consumption, approximately 4.8 liters of water were needed to produce a liter of ethanol. Finally, the energy targeting through conventional Pinch Analysis lead to 19.1 MW and 18.7 MW of hot and cold utility energy demand for the entire process, respectively.

Keyword : Bioethanol ; biorefinery modeling and simulation ; biomass pretreatment ; enzymatic hydrolysis ; integrated biorefinery

V.1 Introduction

Nowadays, the transition from the petroleum economy towards biofuel economy is highly accepted on both the national and international levels (Mesfun et al.; 2019). Consequently, biofuels, especially from the second-generation, have gained a huge interest in the view of the current environmental problems and oil dependence. Furthermore, lignocellulosic biomass is perceived as an attractive candidate for second-generation biofuel production because its price is estimated as being the lowest compared to starch-based feedstock currently used to produce certain biofuels, and also because it is non-competitive with agro-food cultures (Bryngemark; 2019; Chovau et al.; 2013).

France is endowed with forestry that can potentially provide a sustainable source of lignocellulosic biomass for bioethanol production. According to the national forest inventory, the forested mainland in France covers 17.106 ha. This corresponds to an afforestation rate of 29.7% of the territory close to the world rate and which is also increasing. It includes 136 species of

1. Corresponding Author : christophe.vial@uca.fr

trees (Rametsteiner et al.; 2007). Therefore, the local wood processing industries generate a significant amount of multisource sawdust and other wastes, especially from softwood. However, if these multisource wastes were to be converted into biofuels, they could allow satisfying a wide part of energy demand, which is still mainly covered by petroleum products. Moreover, this will create a new opportunity for the forestry sector to contribute to the development of a reliable and sustainable national energy model that fits well with the energy transition policy and the fight against climate change (Sarks et al.; 2014).

Sawdust from the sawmill industry is a low-cost industrial residue that contains a significant amount of carbohydrates with the potential to be a raw substrate for bioethanol production in a biorefinery plant. Its use could promote local valorization of wood waste with a view of setting up a forest biorefinery. Its chemical structure is mainly constituted of cellulose, hemicellulose, and lignin, which makes it recalcitrant to deconstruct, thereby limiting enzyme ability to convert cellulose and hemicelluloses into sugars (Mupondwa et al.; 2017). Hence, in order to make sugars available for bioconversion, four key steps are needed. First, the pretreatment process is compulsory to overcome the barrier that lignin constituted in the substrate. Thus, this step allows the destruction of the sawdust matrix to make the cellulose more accessible to the enzymes. Afterward, the pretreated solid is either chemically or enzymatically hydrolyzed to transform cellulose and hemicelluloses into sugars. Third, fermentation is performed on the rich sugar hydrolysate from the previous step to transform the latter into ethanol, and finally, distillation allows the separation of ethanol from the fermentation broth.

The pretreatment stage has been identified as the real technological and economic barrier to the development of lignocellulosic-based bioprocesses. Efficient pretreatment step is, therefore, essential to fractionate lignocellulosic structures for subsequent chemical transformations. An efficient pretreatment process must be able to reduce the crystallinity of the cellulose within a reasonable time, improve the accessible area for the extraction of desirable components, and increase the hydrolysis rate after pretreatment (Agbor et al.; 2011; Chin et al.; 2020).

Organosolv pretreatment is a promising pretreatment for lignocellulosic materials. The concept of this process was derived from paper industry as an alternative to Kraft pulping and sulfite process, overcomes several inconveniences, such as severe water and air pollution (Bajpai; 2018; Tribot et al.; 2019; Zhou et al.; 2018). It is based on the extraction of lignin and hemicelluloses from wood materials using organic solvents with or without a catalyst (Zhang et al.; 2016). However, the use of a catalyst (mineral acids, bases, or organic acids) allows to lower the pretreatment temperature (Tribot et al.; 2019). The optimal temperature and exposure time are also interrelated. In general, a shorter exposure time requires a higher temperature and vice versa (Chin et al.; 2020). Commonly used organic solvents in Organosolv pretreatment are ethanol, methanol, acetone, or a mixture of water and organic solvent at temperatures ranging from 100 to 250 °C applied for a specific time (30–150 min). Low-boiling alcohols, such as methanol

and ethanol, appear to be the most suitable organic liquids for use in Organosolv processes due to their low cost and easy recovery (Brosse et al.; 2009; Zhao et al.; 2009). Finally, ethanol is by far safer and preferred to methanol because of its low toxicity (Borand and Karaosmanoğlu; 2018; Zhao et al.; 2009).

In the present work, a computer model able to simulate the conversion of second-generation sawdust feedstock to the bioethanol process is developed. Possible applications already documented refer to actual demonstration factories currently in operation or under construction in the European Union (Gnansounou and Dauriat; 2010). Such a tool is devoted to apprehending the main steps of the process, focusing on key aspects from the perspective of engineering thermodynamics. It provides a useful tool for the preliminary analysis of various plant configurations, allowing a potential reduction of costs for the plant. Mass and energy balances are modeled to allow a comparison between various technological solutions. This tool also notably makes it possible to assess the potential recovery of waste streams from the main process, in particular about lignin-rich residues. An Organosolv process based on ethanol/water mixtures as the solvent was selected to fractionate sawdust feedstock into its main components. Alio et al. (2019)investigated for the first time the fractionation of sawmill mixed feedstock of four softwood species using a microwave-assisted Organosolv pretreatment. Subsequently to this study, hydrolysis and fermentation steps of a pretreated feedstock were carried out (Abdou Alio et al.; 2020). The ProSimPlus simulator is a powerful tool to carry out process simulation which is able to model the bioethanol production plant using lignocellulosic waste feed, such as sawdust or other residues. The chemical composition of sawdust and other streams of the process measured experimentally in previous works was used as the starting point in the simulation of the biorefinery to produce lignocellulosic bioethanol using ProSimPlus as a process simulation software. The design of the plant included not only the Organosolv pretreatment, the enzymatic hydrolysis, and the fermentation steps, but also focused on distillation for ethanol recovery, water-saving, and energy integration. Lignin is recovered as a co-product for further use in added-value biocomposite materials (Tribot et al.; 2019).

According to (Rodrigues Gurgel da Silva et al.; 2018), only a few researchers have turned their attention to investigate the synthesis, design, and process simulation of a large-scale Organosolv plant. Thus, the originality and the main objective of this paper is to fill this gap and develop a detailed process using the theoretical concepts and the experimental results (yields and compositions) from previous investigations (Abdou Alio et al.; 2020; Alio et al.; 2019) as a starting point to develop simulation of mass and energy balances based of an Organosolv pretreatment.

V.2 Materials and methods

The ethanol biorefinery process design in this study is adapted from previous works by NREL (National Renewable Energy Laboratory) according to Humbird et al. (2011) in order to include an Organosolv instead of a dilute-acid pretreatment. Thus all the data summarized in Table V.1 were collected from the technical investigation of the feedstock for all bioethanol processes step (Abdou Alio et al.; 2020; Alio et al.; 2019). As said earlier, these data were used as the starting point for the modeling and simulation activities in this assessment to obtain ethanol and other chemicals from the sawdust material.

As major assumptions made for this analysis, a typical large-scale production plant is considered : the amount of waste collected by the company is 200 tons/day ; the moisture content of which is estimated at 40%, which gives 120 tons of dry biomass processed per day. It is also considered an operating period of 350 days per year which is the equivalent of 8410 hours/year (96% process uptime).

V.2.1 Modeling and simulation

The simulation of ethanol production from lignocellulosic biomass was carried out using ProSimPlusTM3.6. ProSimPlus is a French powerful software for running a multiphase process developed by PROSIM S.A. (Labège, France), including reliable thermodynamic data and comprehensive databases. For the current research, the NRTL (non-random two-liquid) property thermodynamic models were mainly used in the simulations. Ideal Gas was used for the simulation of combustion gases and NBS/NRC steam tables model was used in the simulation of water utilities. Components from ProSimPlus data banks were used whenever possible. The components and the properties which were not available in the software databases were obtained from the NREL data banks for production from lignocellulosic biomass and added in the model. Consequently, the BIODFMS3 physical properties database published by NREL was implemented and used in this study (Aden et al.; 2002). As mentioned earlier, the simulations considered the setup of a plant processing 200 tons of feedstock per day.

V.2.2 Process model overview

The conventional NREL process model comprises nine following areas : feed handling, pretreatment and conditioning, enzymatic hydrolysis and fermentation, cellulase enzyme production, product recovery, wastewater treatment, storage, combustor, boiler and turbogenerator, and utilities. In this study, only eight areas were studied, as shown in Fig. V.1 : commercial enzymes were used without local production. Simulation of water treatment is simplified to implement water recycling. The process produces bioethanol and lignin, while the solid residues in addition to fresh bark to provide the hot utilities of the process ; solvent and water are recycled. The process model description is summarized below.

Table V.1: Main process data for simulation of ethanol production from wood waste

Features	Values		
Feedstock			
Sawdust Composition	Cellulose 44.3% ± 0.5% (dry wt.), Hemicellulose 25.6% ± 0.2% (dry wt.), lignin 26% ± 3% (dry wt.)		
Moisture content	40%		
Bark Composition	Cellulose 28.3% ± 1.2 % (dry wt.), hemicellulose 13.0% ± 0.8% (dry wt.), lignin 52% ± 4.2% (dry wt.)		
Moisture content	20%		
Reactors			
Type	**Pretreatment Organosolv**	**Enzymatic Hydrolysis**	**Ethanol by Fermentation**
Solvent	Ethanol/water (60 :40)	Water	Water
Catalyst	H_2SO_4	Cellulase and hemicellulase	*Saccharomyces cerevisiae*
Concentration	0.25%	18.42 g per kg of slurry	10% of fermentation volume
Temperature	175 °C	50 °C	30 °C
Pressure	13.8 atm	1 atm	1 atm
Residence time	60 min	12 days	24 h
pH	-	5	5
Separations			
Solvent recovery	**Concentration C201**		**Rectification C202**
Number of stages	15		40
Stage efficiency	57%		57%
Feed stage	2		25
Reflux ratio	0.03		1
Condenser	Total		Total
Pressure	1.0 atm		1.0 atm
Ethanol recovery	**Concentration C401**		**Rectification C403**
Number of stages	32		60
Stage efficiency	48%		57%
Feed stage	2		40
Reflux ratio	3		3.2
Condenser	Partial		Partial
Pressure	2.1 atm		1.9 atm
Additional	Withdrawal stage 8		Feed stage 20
Scrubber	**Absorption column C402** (5 stages, 1.0 atm, non-isothermal)		
Ethanol dehydration	Pressure swing adsorption molecular sieves C404 (95.0 °C, 1.53 atm)		

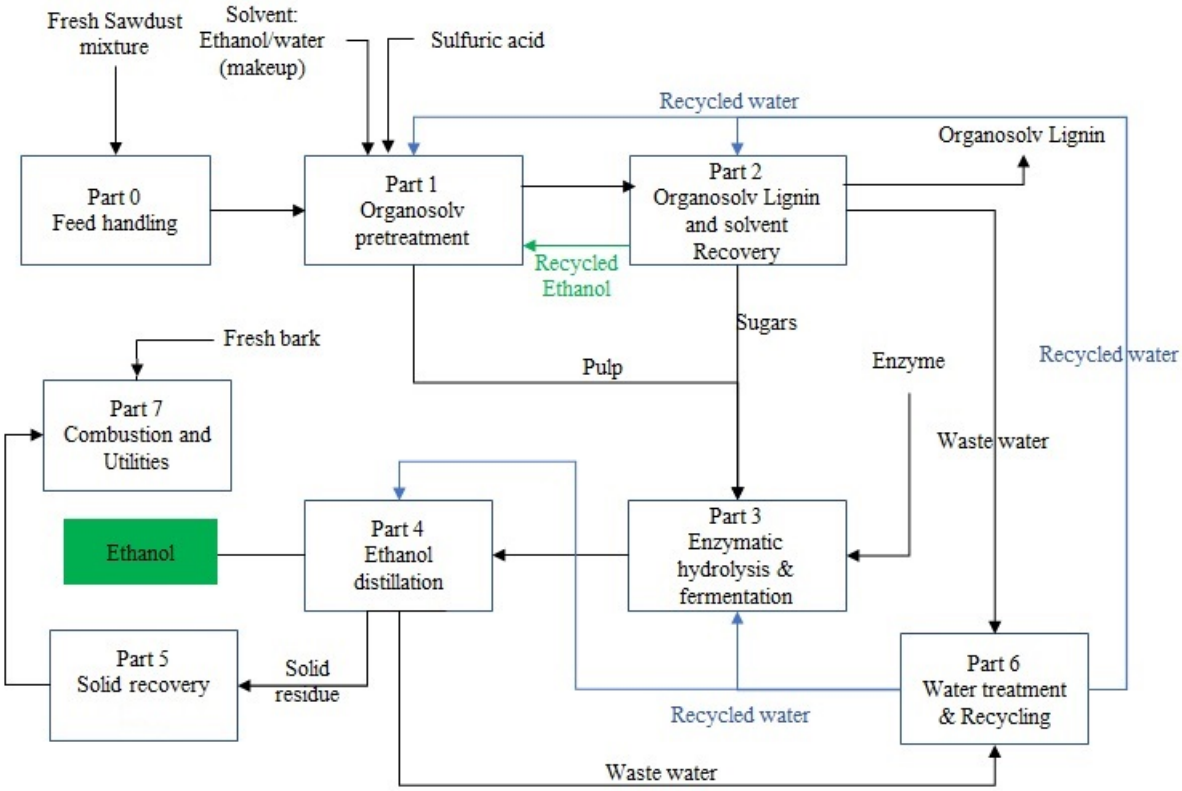


FIGURE V.1: Simplified bioethanol production hierarchy block diagram

V.2.2.1 Part 0 : feedstock handling

The feedstock was collected and supplied from different surrounding sawmill industries as sawdust ; hence, comminution was not included explicitly in this study. The transportation distance (between 50 and 100 km) of sawdust was estimated based on land patterns in France.

V.2.2.2 Part 1 : Organosolv pretreatment

Sawdust mixture was stored in a sufficient amount to ensure the continuous operation of the biorefinery. The feedstock was transported by a conveyor to a mixer (M101) where an ethanol/water mixture (60 :40 v/v) was added to the reactor in a solid-to-solvent ratio of 1 :16 (w/v) (Fig. V.2). As a catalyst, sulfuric acid was added in a total of 0.25% (w/w) to dry wood sawdust matter. The mixture was sent to the pretreatment reactor (R101). The reactor operated at 175 °C and 14 bars of pressure with a total residence time of 60 min. Once the reaction is done, the pressure was reduced to atmospheric.

V.2.2.3 Part 2 : Lignin and solvent recovery

The flashed reactor effluent was then separated in gas-liquid separator S201 (Fig. V.3). The evaporated solvent was sent to the solvent recovery columns and the pretreated mixture was filtered by passing through S202 solid-liquid separator to obtain a solid-rich pulp (PULP), and another liquid-rich stream (Liq.) called black liquor. The wet solid fraction was mainly

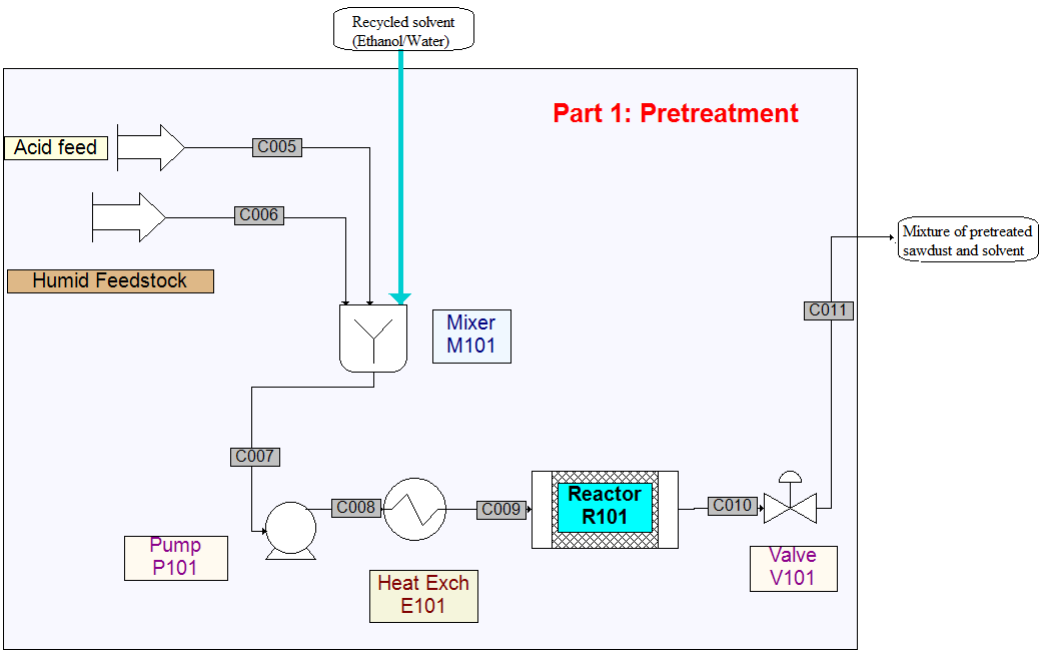


FIGURE V.2: Simulation flowsheet of the Organosolv pretreatment

constituted of cellulose, while the liquid fraction contained dissolved hemicelluloses, lignin, and the remaining solvent. The solid stream was sent to a two-stage washing step (M201 et M202), where a mixture of ethanol/water with the same concentration as in the reaction stage was used, first, for cleaning the fibers and to recover some of the solvent and the remaining lignin. The resulting washing effluent was mixed with the liquid-rich stream, which can be treated to recover by-products (Organosolv lignin, furfural, HMF (5-hydroxyl-methylfurfural)), and solvent. The second stage of the washing process was performed with water in a solid/water ratio of 1 :2 to remove the remaining solvent present in the solid-rich stream. After the washing process, the pulp was sent to the mixing tank reactor (R301) for enzymatic hydrolysis (part 3).

The total effluent streams composed of washing solvent, water, and a by-product as degraded cellulose (glucose), hemicellulose (xylose) and lignin were sent to the mixing tank (M203) so that all the by-products and solvent can further be recovered (Fig. V.3). First, sulfuric acid was added to the mixing tank to allow the precipitation of lignin which will later be separated by filtration S204. This lignin is called Organosolv lignin. The liquid stream was treated with two distillation columns. The first distillation column (C201) was used to separate the solvent from the fermentable sugars (xylose and glucose) that were afterward sent to the fermentation reactor (R302). After, the first distillation, the sugars-free stream (C018) was sent to a second column (C202) where the ethanol at the top column was distilled to be recycled and re-used at the pretreatment step. The water stream (C022) at the bottom of the column was forwarded to the water treatment and recycling part (Part 6). This area allows reducing the fresh makeup solvent required.

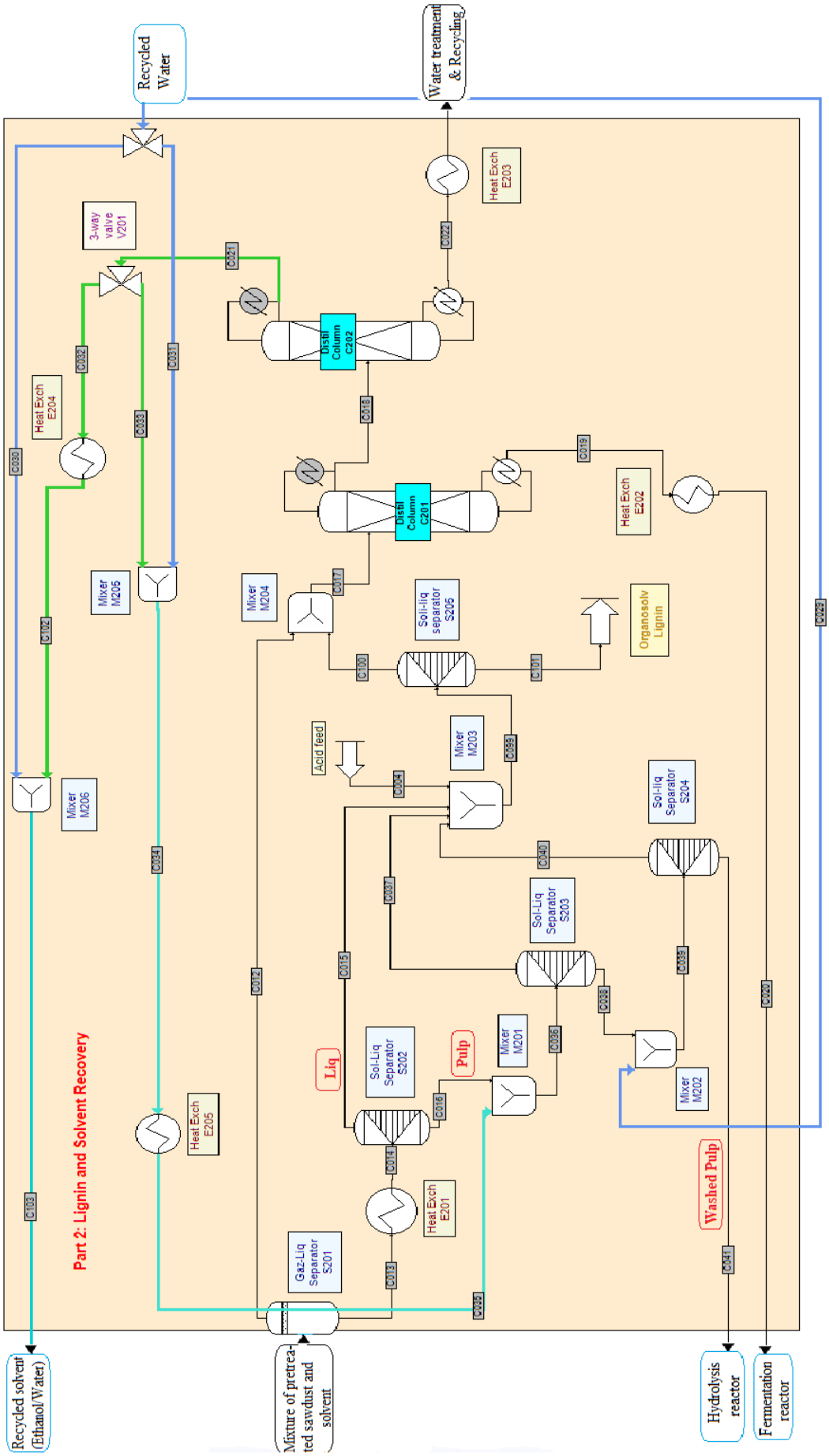


FIGURE V.3: Simulation flowsheet for lignin and solvent recovery

V.2.2.4 Part 3 : enzymatic hydrolysis and fermentation

Several studies used separate hydrolysis and fermentation processes in their analysis. It was decided to use a similar setup in this study (Fig. V.4), but data for modeling and simulation were modified, accounting for the raw materials from the Organosolv process applied to sawdust and for the experimental results of fermentation and hydrolysis assays Abdou Alio et al. (2020).

V.2.2.4.1 Enzymatic hydrolysis

The hydrolysis of the pulp stream can be performed by enzymes or acids (diluted or concentrated) catalysis. For bioethanol production using lignocellulosic materials, the enzymatic hydrolysis was demonstrated to be the most promising way for converting cellulose and hemicelluloses into simple sugars. Thus, the washed solid-rich was subjected to hydrolysis under a specific substrate charge. More specifically, the solid-rich stream reached the R301 reactor (Fig.V.4) where it was diluted to a solid content of 10% (w/w) in a 50 mM buffer (pH 5). The enzyme used was Cellic® Ctec2 (A/S, Bagsvaerd, Denmark) with a total enzyme amount of 18.42 g per kg of the slurry. The enzymatic hydrolysis occurred at 50 °C in R301 for 12 days. This step requires the use of several reactors in parallel for enzymatic hydrolysis to ensure continuous production.

V.2.2.4.2 Fermentation

Several microorganisms, such as bacteria, fungi, and yeast can ferment sugars to bioethanol. The most employed microorganism in fermenting carbohydrates from lignocellulosic is the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, due to its high tolerance and robustness to inhibitory compounds. Consequently, after 12 days of hydrolysis, the stream from the enzymatic hydrolysis was further cooled up to 30 °C, mixed with the sugars recovered from C201, and sent to the fermentation reactors (R302), where *Saccharomyces cerevisiae* strain was added to the hydrolysate (Fig. V.4). The fermentation took place in a 24 h time and had an initial inoculum level of 10% volume. Subsequently to the fermentation, the beer broth was sent to a beer well for separation and further ethanol purification.

V.2.2.5 Part 4 : Ethanol recovery

After fermentation was finished, the fermentation broth consisted of ethanol, a variety of undesired co-products, and a large portion of water. Therefore, there are several technologies convenient for ethanol purification, such as pervaporation, multiple column distillation, liquid-liquid extraction, and so on, that use the differences in the physical and chemical properties of ethanol from unwanted products as the driving force for separation. Depending on the product that needs to be recovered and the composition of the mixture, an appropriate separation technology must be chosen. Hence, in this study, ethanol recovery was carried out in a multi-column separator (Fig. V.5) similar to the one proposed by Aden et al. (2002). First, the fermentation broth was sent to a flash process to remove the main part of the carbon dioxide present in the flow (C047), and the resulting flow stream was sent to the mixer (M401). From this mixer, the

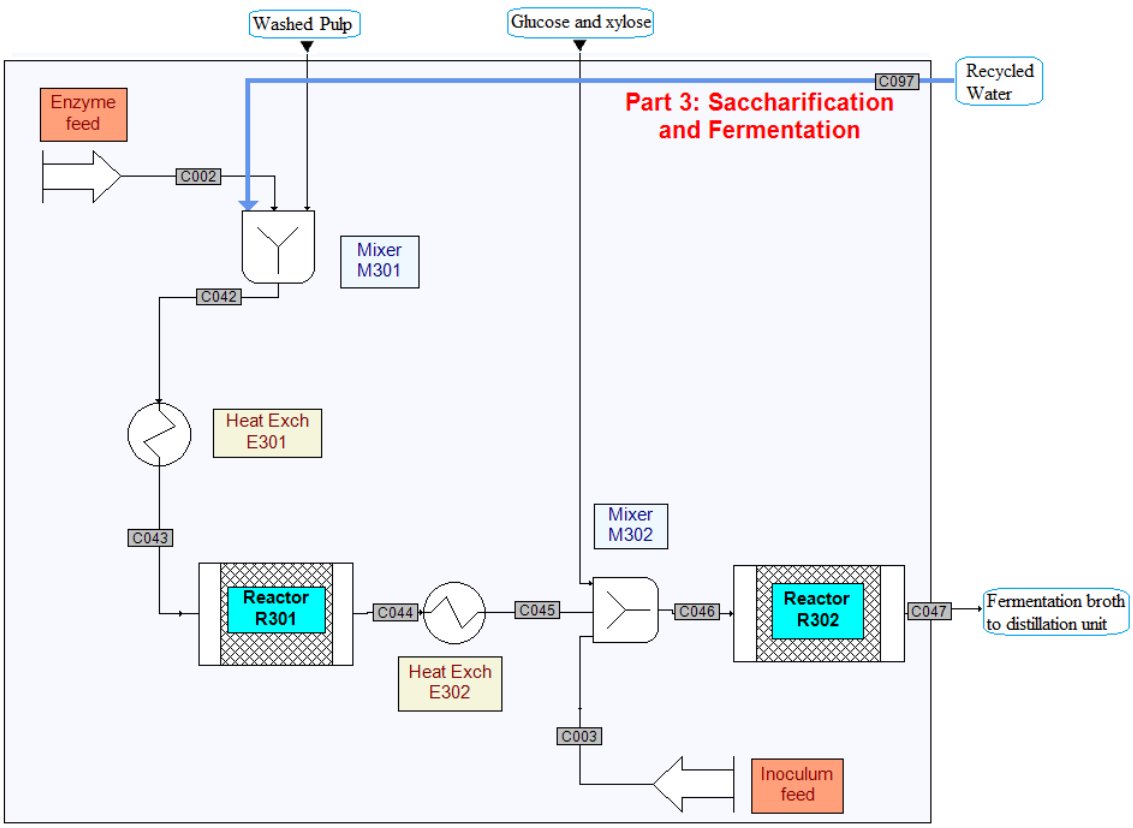


FIGURE V.4: Simulation flowsheet for hydrolysis and fermentation steps

broth was directed to the first distillation column (C401) where three streams were separated. The overhead stream was rich in carbon dioxide and contained about 13% (w/w) ethanol. This flow could be mixed with the fermentation vent and sent to a vent scrubber (C402), where water was added in a counter-current configuration to recover ethanol present in the vapor phase. The effluent from the scrubber was returned to the beer well. The bottom product of the distillation column contained the unreacted and dissolved solids, which can be dried and burnt for energy production (Part 6). Finally, an intermediate withdrawal containing 42% (w/w) ethanol, i.e. 99.5% of the total ethanol from the R302 effluent, was sent to the rectification column (C403). It was then purified to the nearest azeotropic point, and then, sent to the molecular sieves to decrease residual water. Two streams left the molecular sieves : ethanol at 99.5% (w/w), and lower concentration ethanol (72%) that could be returned to the distillation column. The rectification column bottom containing less than 0.1% (w/w) ethanol was sent to water recycling.

V.2.2.6 Parts 5, 6 and 7 : Solid recovery, wastewater treatment, combustion and utilities

The residual solids and dissolved sugars from the beer bottom were concentrated through a triple-effect evaporator as proposed by Aden et al. (2002). Solids were removed after the first effect and concentrated syrup was recovered after the third effect ; both were mixed and sent to a combustion chamber at a moisture content of 51%.

Part 6 was dedicated to water treatment. Main assumptions are total removal of organic dissolved matter and 1.0% of entering water is not recycled.

Finally, part 7 provided the hot utilities of the process by burning the unreacted solids and sugars concentrated in Part 5. Another wood waste fresh bark was also burnt in the combustion chamber to meet energy requirements. Additional 200 t/d of fresh bark, whose composition is given in Table V.2, were necessary to produce 900 t/d of steam at 60 bars and 478 °C. This steam was used in a Rankine cycle at four levels of pressure respectively 60, 10, 2, and 0.125 bars. The cycle was simulated with three turbines to produce electricity and two withdrawals at intermediate pressures of 10 and 2 bars, respectively, to provide hot utilities to the process.

V.2.3 Key technical parameters

The key technical parameters used in ProSimPlus simulations were obtained from Abdou Alio et al. (2020); Alio et al. (2019), as mentioned earlier. In the pretreatment stage, most of the hemicelluloses are degraded into xylose and furfural, and the crystalline structure of most of the cellulose is broken down, increasing enzyme accessibility to the cellulose for hydrolysis step before the fermentation step. Enzymatic hydrolysis includes cellulose and hemicellulose conversion into sugars. Fermentation of C5 and C6 sugars are also considered.

Table V.2: Summarizes the data needed to simulate the process.

Technical parameters		Yield
Pretreatment	Cellulose to glucose	16.5%
	Hemicellulose to xylose	81%
	Lignin removal	45.8%
	Ash	0%
	Extractives	100%
Enzymatic hydrolysis	Cellulose to glucose	80%
	Hemicellulose to xylose	60%
Fermentation	Glucose to ethanol	99%
	Xylose to ethanol	64%

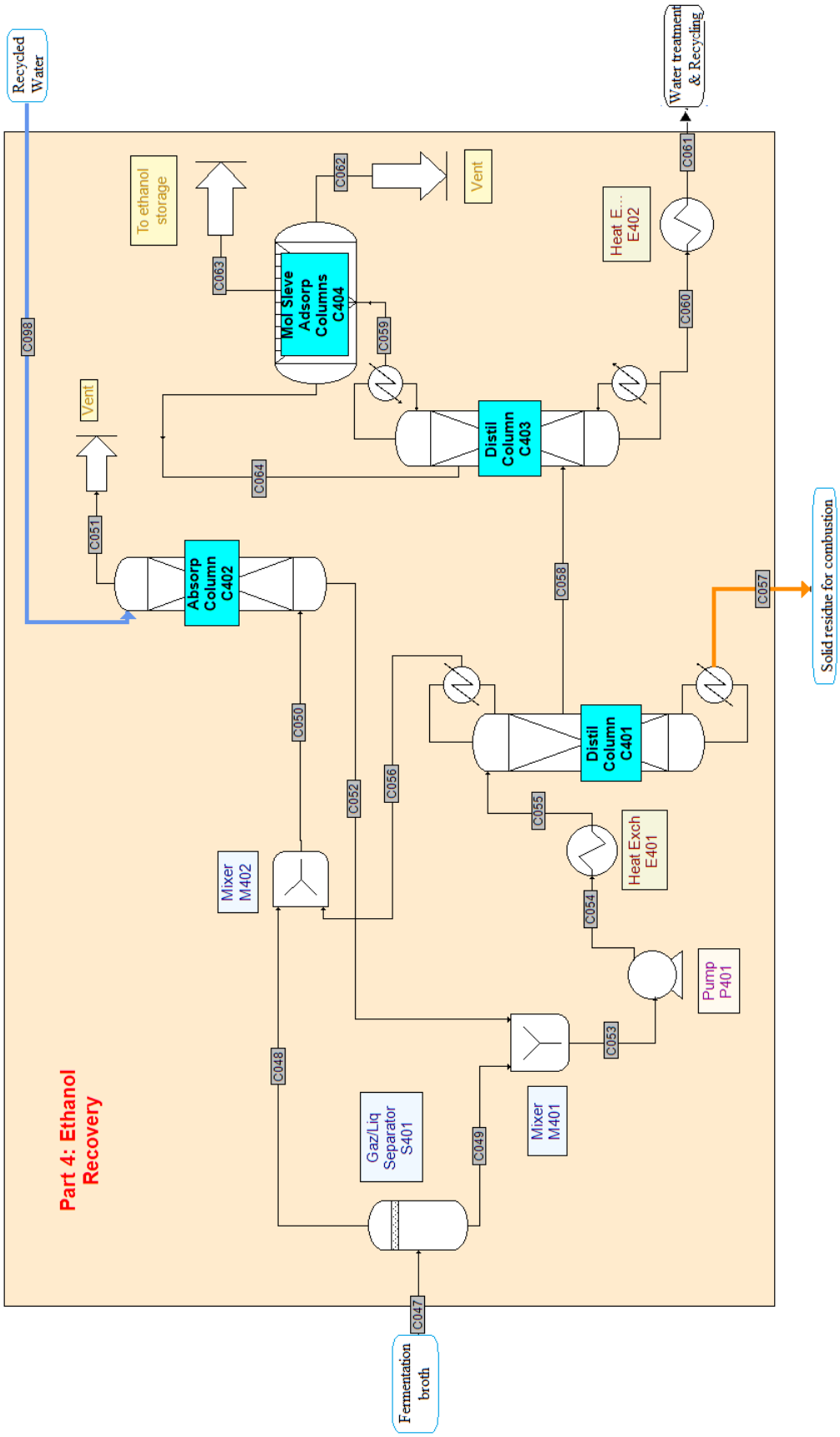


FIGURE V.5: Simulation flowsheet of the setup for ethanol separation and purification

V.2.4 Heat integration

The ProSimPlus simulation showed that hot and cold external utilities were required to meet the needs of ethanol production utilities. Since external utilities are expensive and require large quantities, the ability to integrate heat between processes was investigated using process pinch technology. In this article, an integrated ProSimPlus module was used to apply process pinch analysis. Pinch Analysis established a hot and cold composite curve from the available hot and cold streams in the flow diagram. Later, the two composite curves built from the hot and cold streams were compared with each other at a minimum approach temperature to determine the possible amount of heat exchange (integration) between the hot and cold flows. This integration of heat between processes reduced the external hot and cold energy requirements of a production circuit. In this work, the minimum approach temperature ΔTmin of 10 °C was used for the pinch analysis. Hot effluents of the process were integrated in the calculations by cooling down to a temperature of 25 °C. Phase change was linearized for the calculations in the pinch module.

V.3 Results and discussion

This process model was set up to assess the viability of a second-generation ethanol production process, which uses a mixture of sawmill waste of softwood as the feedstock, biomass widely available in Auvergne-Rhône-Alpes region (France) as a forest residue or from dedicated short-rotation forestry. An efficient conversion process of the cellulosic and hemicellulosic biomass into liquid ethanol, combined with a valorization of the lignin content, would allow an energy conversion that would meet the ever-growing energy demand. The simulation considered the scale-up of the laboratory and pilot-scale systems used to estimate the data to produce significant results in terms of mass and energy balances for the design and the development of new industrial perspectives. However, the results presented in this section will focus first on mass balances.

V.3.1 Ethanol production mass balance

The analysis of the ethanol production simulation process from lignocellulosic residues is turned towards process productivity. In this case, from the initial 200 tons of sawdust feedstock per day, simulations showed that the product stream from Organosolv pretreatment yielded 33.11 tons of ethanol per day (1,380.2 kg of ethanol/h), as shown in the C063 stream (Table V.3). The ratio between ethanol production expressed in liters and the mass of dry biomass consumed expressed in tons is, therefore, 349 L/ton. In detail, almost all the glucose was consumed during the fermentation. This was mainly obtained in the enzymatic hydrolysis step. In the pretreatment step, only a small fraction of cellulose was converted into glucose. In this sense, the cellulose conversion was limited to 16.2%. In the enzymatic hydrolysis, the conversion of cellulose into glucose reached 80%. However, it arises that 35% of the hemicellulose of the raw materials remained unconverted in the process, probably due to the lack of efficiency of *S. cerevisiae* for

converting xylose into ethanol. It must be mentioned that the combination of columns C201 and C202 allowed to remove the furfural from the sugars produced in the pretreatment reactor (0.7 t/d of furfural in stream C011 and 0 in stream C046). Consequently, the conversion into ethanol could be raised by recycling those sugars (stream C044 and C046) into the fermenter R303 without any risks of inhibition.

The results thus highlighted an ethanol production of approximately 11,600 tons of ethanol/year with a biomass feed of 42,052 tons of dry biomass per year, which is in the common range found for this kind of process. For example, for the same quantity of dry feedstock, Porzio et al. (2012) obtained less than 10,000 tons of ethanol/year by using a two-stage dilute acid steam explosion pretreatment and a productivity of only 303–316 L/t dry biomass. The results also outperform the simulations of the diluted acid process reported by Rodrigues Gurgel da Silva et al. (2018). Conversely, based on an Organosolv process modeling on the same feedstock quantity, their simulations yielded a higher ethanol production of 11,922 tons of ethanol/year. But this ethanol amount was achieved because the authors considered a high conversion of both xylan and cellulose into convertible sugars, thus into ethanol. First, it must be pointed out that the present work uses a mixture of softwood species as the feedstock, contrary to the literature which always deals with a unique wood specie. This drawback was partially counterbalanced by a higher ethanol concentration achieved in the fermentation in the present study (12.7% w/w) than in Rodrigues Gurgel da Silva et al. (2018)'s case (11.1% w/w), which highlights the effectiveness of our pretreatment. In addition, C5 fermentation was not favored in this work, as stated above, so that ethanol production could still be enhanced by fermenting xylose in the residue (C057) so that ethanol productivity could outperform the literature in this case.

Finally, Table V.4 illustrates these statements by displaying a detailed comparison of ethanol concentration in the fermenter, and ethanol productivity values with the literature.

Table V.3: Process streams mass balance in tons/d of the flowsheet

Streams	C006 Fresh saw-dust	C009 E101	C011 R101	C016 Pulp	C015 Liq	C101 Org. lignin	C020 E202	C044 R301	C046 M302	C047 R302	C055 C401	C057 Residue	C058 C403	C063 Ethanol	C024 Water Treat.
Water	76.7	139.5	136.0	-	169.7	-	56.7	107.7	232.1	232.1	274.1	224.5	49.6	0.2	157.7
Carbon dioxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.6	0.5	-	0.0	-	-
Ethanol	-	180.0	180.0	-	74.1	-	-	-	-	33.1	33.2	0.0	33.1	33.1	-
Sulfuric acid	-	0.5	0.5	-	0.7	0.7	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-
Glucose	-	-	8.6	-	8.6	-	8.6	41.4	50.0	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Xylose	-	-	26.2	-	26.2	-	26.2	5.8	31.9	11.2	11.2	11.2	0.0	-	-
Cellulose	53.2	53.2	44.4	44.4	-	-	0.0	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	0.0	-	-
Hemicellulose	30.7	30.7	6.8	6.8	-	-	-	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	-	-	-
Lignin	31.1	31.1	31.1	12.2	18.9	18.9	0.0	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2	0.0	-	-
Furfural	-	0.0	0.7	0.0	0.4	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-
Enzyme	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	0.0	-	-
S. cerevisiae	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-	-
Acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.5	5.5	5.0	0.5	-	-
HMF	-	-	0.8	0.8	-	-	0.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.0	-	-
Total flow (t/d)	191.7	435.0	435.0	64.1	298.6	19.6	91.4	177.8	339.9	339.9	350.8	267.0	83.2	33.3	157.7
T (°C)	25.0	175.0	174.6	33.2	48.5	48.5	30.0	50.0	30.0	45.3	100.0	123.4	112.1	92.1	25.0
P (atm)	1.0	13.8	13.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.1	2.1	1.9	1.7	1.0
Vap. fraction (w/w)	-	0.4	0.4	-	-	-	-	-	-	0.1	0.0	-	1.0	-	-

Table V.4: Comparison of process data between the present studied case and one from the literature (Rodrigues Gurgel da Silva et al.; 2018) for an alternative Organosolv and a diluted acid pretreatment.

	Studied case[a]	Organosolv[b]	Diluted acid[b]
Ethanol productivity (kg/h)	1380.2	1417.2	1271.7
Ethanol concentration (% w/w)	12.7	11.1	5.4
Hot utilities (MW)	19.1	18.7	11.7
Cold utilities (MW)	18.7	15.0	5.1
Total energy (MW)	37.8	33.7	16.8
Energy (kWh)/kg of ethanol	27.4	23.9	13.2
Water consumption (kg/h)	8417.0	8332.2	22090
Ethanol/water ratio (L/L)	4.8	4.7	19.0
Ethanol/dry biomass ratio (L/t)	349	358	232

[a] Results obtained for 120 tons of dry biomass per day of sawmill mixed feedstock
[b] Results obtained from 2124 tons of dry biomass of spruce feedstock per day have been normalized based on 120 tons of dry biomass per day

V.3.2 Water mass balance

Water consumption in the biochemical conversion process is generally considered high compared to a thermochemical pathway process or even a petroleum-based fuel process, in terms of a liter of water used per liter of fuel produced (L/L). The overall water balance according to the simulation results indicate the water consumption. Additional water enters the process via the raw material and raw chemicals, both as free water, and "potential" water, i.e. the burning product of lignin and unconverted sugars. Also, water is utilized in the hydrolysis reactions. Based on actual make-up water flow, the current design needed water consumption of 8417 kg/h versus 8,760 kg/h from Humbird et al. (2011) for a plant that has the same feedstock throughput, using an acid-based pretreatment. Conversely, 8332 kg of water/h were consumed according to Rodrigues Gurgel da Silva et al. (2018) flowsheet design using an Organosolv pretreatment under the same feedstock throughput. However, based on the detailed ethanol yield from the ProSimPlus simulation, the water consumption in the design, about 4.8 liters of water used per liter of ethanol, was nearly the same as that obtained in the Organosolv simulations of the literature and far lower than in the NREL study (7.65 L/L) or with diluted acid pretreatments (Table V.4). The key advantage of the Organosolv pretreatment, as already emphasized by the literature, is that it saves water in comparison to conventional acid or steam explosion processes. In order to be economically feasible, the overall process needed to recover as much as possible the solvent (water and ethanol) used in the process. Based on the simulation data gathered in Table V.3, up to 99.9% of the ethanol and 99% of the water that were used initially were recycled. But the recovery increased the whole process energy demand.

V.3.3 Energy balance

All hot and cold process streams extracted from a flowsheet model of the studied case design were listed in Table V.5. By summing all thermal loads of all cold and hot flows, the maximum hot and cold utility requirements of the studied case were obtained. Thus, the hot and cold utilities demand represented 19.1 and 18.7 MW, respectively. Among this demand, distillation columns were the most important part of the energy consumption respectively 65%for boilers and 71% for condensers. The energy per ethanol produced was 27.4 kWh per kg of ethanol. This energy demand is consistent with the data from the literature (Table V.4). For an Organosolv process, Rodrigues Gurgel da Silva et al. (2018) found 18.7 and 15.0 MW as utility requirements and 23.9 kWh per kg of ethanol. The difference between their simulations and this work is the simulation of part 5 which is the evaporation of the solids and syrup that requires hot and cold utilities. Without part 5, the energy falls to 24.0 kWh/kg of ethanol. On the other hand, the acid diluted process is much less energy-intensive (13.2 kWh/kg of ethanol). The origin of the rather high energy demand of the whole process can be identified in the solvent recycling unit. This counterbalances the higher ethanol productivity and water efficiency of the Organosolv process. In particular, ethanol as the solvent must be recycled and an important amount of water is required in the pretreatment process to dilute ethanol and to cause lignin precipitation. The water terminates in the solvent recycling system, which requires the highest energy input.

V.3.4 Pinch Analysis and further heat integration

Based on the data of Table V.5, the next step in the Pinch Analysis is to determine energy targets. The energy targets represent the minimum amount of utilities required to meet the process flow requirements (Ghannadzadeh and Sadeqzadeh; 2017). As mentioned in section V.2.4, this was done by plotting composite cold (blue) and hot (red) process curves, as shown in Fig.V.6a.

The hot and cold composite curves give an idea of the heat availability and heat demand in the process, respectively. The pinch temperature was evaluated at 90.2 °C. According to Fig. V.6a, the potential of heat recovery is not very high on this process as the overlay between hot and cold composite curves is rather partial. Maximum energy recovery (MER) was estimated at 2.7 MW. Consequently, the hot and cold utilities demand could be reduced from 19.1 and 18.7 MW to respectively 16.4 and 16.0 MW which would represent less than 15.0% of heat integration on the process. There are two main reasons for this poor heat recovery potential : (i) the flash after the pretreatment reactor (R101) does not allow to use a hot stream at 175 °C that is why the hot composite curve for Fig. V.6a does not reach 175 °C that would raise the MER. The evaporated solvent after the valve V101 represents nonetheless a heat integration because it reduces the energy demand of column C201 by vaporizing the feed of column. (ii) the level of temperature (pressure range) on the distillation columns (C201, C202, C401, and C403) does not allow the heat transfer between condensers and boilers although enthalpy fluxes

Table V.5: Hot and cold streams data of the process including all the different process sections(supply temperature Tin ; target temperature Tout ; heat energy Q ; heat capacity F·Cp)

Streams	Physical status	F·Cp (kW/°C)	T_{in} (°C)	T_{out} (°C)	Q (kW)
Bo. Column C201	Liq	2995.0	100.5	102.0	4236.7
Bo. Column C202	Liq	14 321.5	99.5	99.9	5831.3
C034	Liq	2.9	56.4	70.0	39.7
C008	Liq	29.1	25.7	175.0	4341.5
Bo. Column C403	Liq	8 701.1	119.0	119.1	438.0
C042	Liq	6.4 26.3		50.0	151.0
C054	Liq	15.3	45.5	100.0	833.7
Bo. Column C401	Liq	4 836.4	123.0	123.4	1925.4
C065	Liq-Vap	4 327.6	101.1	101.4	1340.0
Cond. Column C201	Liq-Vap	768.50	90.6	81.0	- 7323.9
Cond. Column C202	Liq-Vap	55 146.0	78.4	78.2	- 5710.1
C022	Liq	7.7	99.9	25.0	- 579.4
C032	Liq	6.6	78.2	25.0	- 351.1
C013	Liq	6.1	90.8	70.0	- 126.8
C101	Liq	0.3	58.8	25.0	- 9.8
C019	Liq	3.3	101.9	30.0	- 237.9
Cond. Column C403	Liq-Vap	224 760.0	95.2	95.2	- 1537.9
C063	Liq	1.1	95.2	25.0	- 75.9
C060	Liq	2.4	119.10	25.0	- 227.1
C044	Liq	6.6	50.0	30.0	-131.9
Cond. Column C401	Liq-Vap	0.5	102.7	60.4	- 20.0
C068	Liq	8.8	101.4	87.0	- 126.0
C074	Liq	3.0	100.1	25.0	- 223.6
C083	Vap	1096.7	62.00	60.4	- 1719.5
C090	Liq	3.1	60.5	25.0	- 109.0
C081	Liq	3.0	86.4	25.0	- 180.0

of condensers are higher than the boilers' one. The grand composite curve confirms that heat recovery in the process is limited. Only small pockets of self-sufficient process to process heat transfer can be seen in Fig. V.6b in the cooling area : between 90 and 86 °C, between 73 and 57 °C for example. The residual cooling necessity (15.9 MW) was obtained thanks to water from 12 to 25 °C with a volumetric flow rate of 25,375 m^3/d. Concerning the hot utilities, two levels of pressure steam were selected : 10 bars high pressure (HP) steam at a condensing temperature of 179.9 °C for temperatures higher than 106.9 °C and 2 bars low pressure (LP) steam at a condensing temperature of 120.2 °C for temperatures between 106.9 °C and the pinch temperature. The unreacted sugars and solids could only partially generate required steam that is why available fresh bark was added to match hot energy requirements. The HP and LP hot utilities steam represented in Fig. V.6b were those produced by the Rankine cycle of part 7. 175 t/d and 470 t/d of HP and LP steam, respectively, were withdrawn for heat transfer on the process. The condensed vapors were then used to preheat water before the cycle boiler. The Rankine cycle could also produce 6,887 kW of electricity, but 10,265 m^3/d of freshwater was also needed for the cycle condenser.

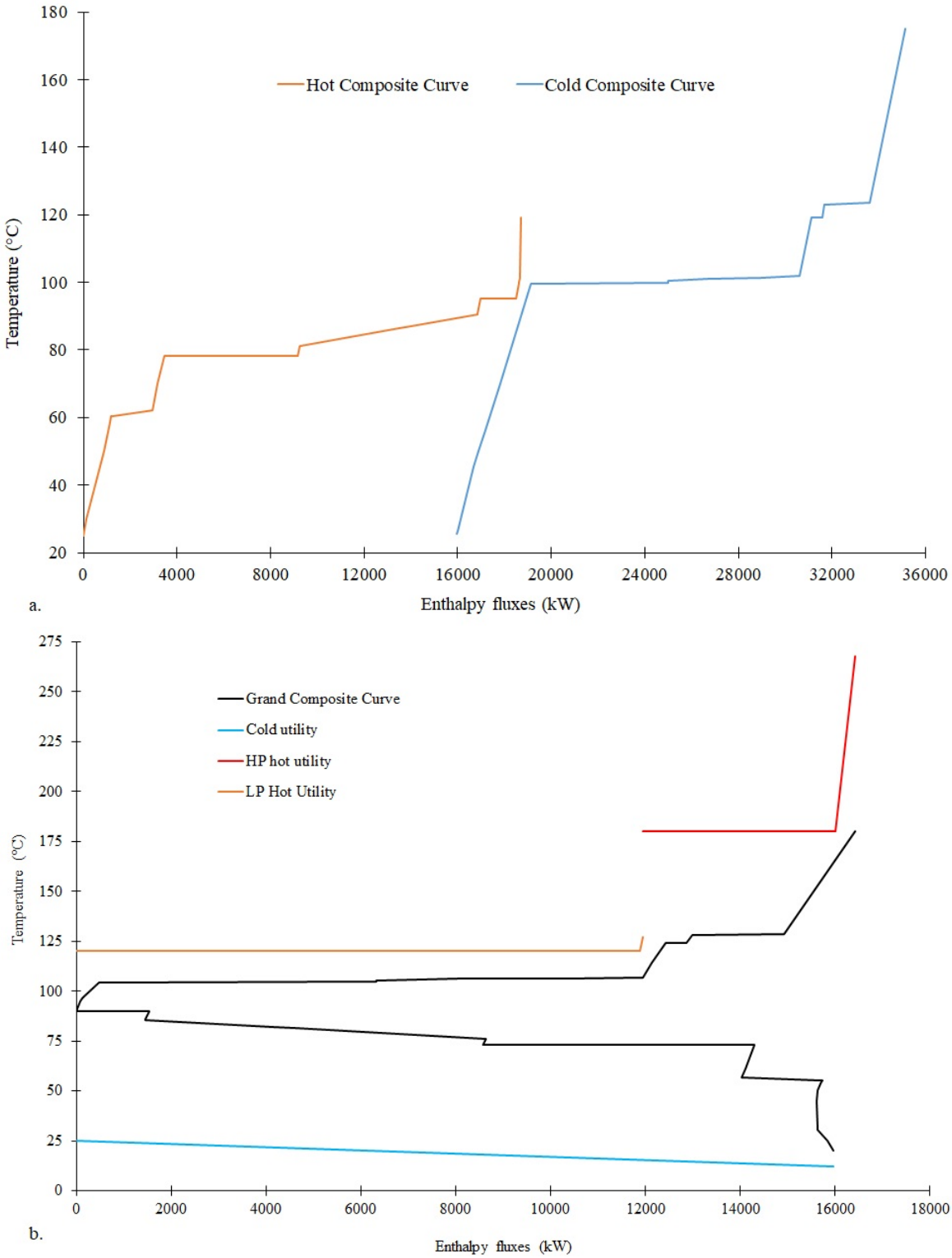


FIGURE V.6: Pinch Analysis results curves of the biorefinery : a) composite curves representing hot and cold streams with ΔTmin=10 °C ; b) grand composite curve with hot and cold utilities simulated for the process

V.3.5 Effect of co-product markets in production cost

According to Table V.3, it can be noticed that the amount of unreacted Residue in the production stream C057 of 21 tons/day which corresponds to 7,344 tons/year is mainly composed of 58% lignin, 32% cellulose, 8% hemicellulose, and 1.7% others. In the present simulations, these unreacted solids were further burned in a perspective of cogeneration, increasing the capacity of heat integration for the process. In another perspective, this solid residue can be used as pellets, but this would increase external energy demand. Furthermore, the potentiality for selling by-products, which are transformed into value-added by-products in the ethanol production plant, also has the prospective for reducing production costs. Outstandingly, expenses occurred in treating industrial effluents to avoid serious pollution problems. For example, Organosolv lignin (18.96 tons/day which represents 6,644 tons of lignin/year) can be purified and transformed into marketable products, i.e. powder lignin that helps balance the economics of the overall production process. Potential applications have been reviewed by Tribot et al. (2019). This will result in cost savings that come either from reduced waste handling costs or from the generation of revenue from the sale of by-products. The consequence is that the economic analysis of the Organosolv process is still difficult to assess, as it strongly depends on the co-products.

V.4 Conclusion

Process simulations demonstrate that an ethanol/water Organosolv pretreatment could be successfully applied to a mixture of softwood species in a forest biorefinery. An ethanol productivity of 349 L/ton of dry biomass is achieved. The biorefinery design enhances water and ethanol savings (4.8 L/L ethanol, and 99% recovery, respectively), at the expense of energy requirements (10.9 and 8.6 kWh/L ethanol for hot and cold utilities, respectively). The plant converts 70,088 tons/year biomass into 11,400 tons/year ethanol. A better understanding of the process was achieved, but further research on the valorization of co-products must help balance the economics of the overall process.

V.5 CRediT authorship contribution statement

Maarouf Abdou Alio : Conceptualization, Methodology, Software. Formal analysis, Writing - original draft. **Alain Marcati** : Software, Methodology, Formal analysis. **Agnès Pons** : Supervision, Conceptualization, Project administration, Writing - review and editing. **Christophe Vial** : Software, Methodology, Conceptualization, Supervision, Writing - review and editing, Project administration.

V.6 Declaration of Competing

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

V.7 Acknowledgments

This work was financed by Auvergne Rhône-Alpes Regional Council, and the European Regional Development Fund (FEDER/ERDF) to promote the valorization of local feedstocks (wood-wastes) on a regional scale.

Bibliographie

Abdou Alio, M., Tugui, O.-C., Rusu, L., Pons, A. and Vial, C. (2020). Hydrolysis and fermentation steps of a pretreated sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery, *Bioresource Technology* **310** : 123412.

Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., Wallace, B., Montague, L., Slayton, A. and Lukas, J. (2002). Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, *Technical Report NREL/TP-510-32438, 15001119.*

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment : Fundamentals toward application, *Biotechnology Advances* **29**(6) : 675–685.

Alio, M. A., Tugui, O.-C., Vial, C. and Pons, A. (2019). Microwave-assisted Organosolv pretreatment of a sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery, *Bioresource Technology* **276** : 170–176.

Bajpai, P. (2018). *Biermann's Handbook of Pulp and Paper*, Elsevier, Amsterdam.

Borand, M. N. and Karaosmanoğlu, F. (2018). Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications : A review, *Journal of Renewable and Sustainable Energy* **10**(3) : 033104.

Brosse, N., Sannigrahi, P. and Ragauskas, A. (2009). Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**(18) : 8328–8334.

Bryngemark, E. (2019). Second generation biofuels and the competition for forest raw materials : a partial equilibrium analysis of sweden., *Forest Policy and Economics* **109** : 102022.

Chin, D. W. K., Lim, S., Pang, Y. L. and Lam, M. K. (2020). Fundamental review of organosolv pretreatment and its challenges in emerging consolidated bioprocessing, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **14**(4).

Chovau, S., Degrauwe, D. and Van der Bruggen, B. (2013). Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **26** : 307–321.

Ghannadzadeh, A. and Sadeqzadeh, M. (2017). Exergy aided pinch analysis to enhance energy integration towards environmental sustainability in a chlorine-caustic soda production process, *Applied Thermal Engineering* **125** : 1518–1529.

Gnansounou, E. and Dauriat, A. (2010). Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol : A review, *Bioresource Technology* **101**(13) : 4980–4991.

Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D. and Dudgeon, D. (2011). Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol : Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover, *Technical Report NREL/TP-5100-47764, 1013269*.

Mesfun, S., Matsakas, L., Rova, U. and Christakopoulos, P. (2019). Technoeconomic Assessment of Hybrid Organosolv–Steam Explosion Pretreatment of Woody Biomass, *Energies* **12**(21) : 1–18.

Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S. and Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol : Part I : Pretreatment technologies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **72** : 178–190.

Porzio, G. F., Prussi, M., Chiaramonti, D. and Pari, L. (2012). Modelling lignocellulosic bioethanol from poplar : estimation of the level of process integration, yield and potential for co-products, *Journal of Cleaner Production* **34** : 66–75.

Rametsteiner, E., Oberwimmer, R. and Gschwandtl, I. (2007). *Europeans and wood : what do Europeans think about wood and its uses : a review of consumer and business surveys in Europe*, Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe, Liaison Unit Warsaw, Warsaw. OCLC : 233931799.

Rodrigues Gurgel da Silva, A., Errico, M. and Rong, B.-G. (2018). Techno-economic analysis of organosolv pretreatment process from lignocellulosic biomass, *Clean Technologies and Environmental Policy* **20**(7) : 1401–1412.

Sarks, C., Jin, M., Sato, T. K., Balan, V. and Dale, B. E. (2014). Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle, *Biotechnology for Biofuels* **7**(1) : 73.

Tribot, A., Amer, G., Abdou Alio, M., de Baynast, H., Delattre, C., Pons, A., Mathias, J.-D., Callois, J.-M., Vial, C., Michaud, P. and Dussap, C.-G. (2019). Wood-lignin : Supply, extraction processes and use as bio-based material, *European Polymer Journal* **112** : 228–240.

Zhang, K., Pei, Z. and Wang, D. (2016). Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals : A review, *Bioresource Technology* **199** : 21–33.

Zhao, X., Cheng, K. and Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**(5) : 815–827.

Zhou, L., Sousa, L. d. C., Dale, B. E., Feng, J.-X. and Balan, V. (2018). The effect of alkali-soluble lignin on purified core cellulase and hemicellulase activities during hydrolysis of extractive ammonia-pretreated lignocellulosic biomass, *Royal Society Open Science* **5**(6) : 171529.

Bilan

L'objectif de ce chapitre était donc de modéliser et de simuler la production de bioéthanol de deuxième génération à l'aide du logiciel ProSimPlus en se basant sur nos résultats expérimentaux obtenus aux chapitres III et IV.

Compte tenu des résultats de ce chapitre, plusieurs conclusions peuvent être tirées quant à la faisabilité d'une bioraffinerie forestière :

— Les simulations du procédé ont démontré qu'un prétraitement Organosolv éthanol/eau pourrait être appliqué avec succès à un mélange d'espèces de bois résineux dans une bioraffinerie forestière.
— La productivité en éthanol est de 349 L/tonne de biomasse sèche.
— La conception de la bioraffinerie permet de réaliser des économies d'eau et d'éthanol (respectivement 4,8 L/L d'éthanol et 99 % de récupération de l'éthanol) par rapport aux procédés classiques en phase aqueuse, mais au détriment d'une consommation plus élevée en énergie (respectivement 10,9 et 8,6 kWh/L d'éthanol pour les utilités chaude et froide).
— L'usine régionale pourrait transformer 70 088 tonnes/an de biomasse humide en 11 400 tonnes/an d'éthanol.

A la lumière de ces résultats, il est clair qu'une meilleure compréhension du procédé dans son ensemble a été obtenue, notamment sur les étapes de purification de l'éthanol, du recyclage du solvant et de la gestion de l'eau qui n'avaient pas été étudiés précédemment, ainsi que sur les besoins en énergie. C'est en particulier l'étape de recyclage du solvant qui est en grande partie responsable de la consommation énergétique additionnelle du procédé. Parmi les points clés qui influent sur le procédé, on peut citer la variabilité de la matière première, mais surtout celle de sa teneur en eau, qui affectent à la fois le bilan énergétique et les besoins en eau dès le prétraitement. Par ailleurs, on retiendra que les valeurs obtenues dans ce chapitre sont en bon accord avec les travaux déjà publiés sur les procédés Organosolv, ce qui démontre qu'il est possible de traiter un mélange de résineux avec un procédé assez proche de ceux appliqués à une seule espèce, condition indispensable pour une bioraffinerie régionale en région AURA. Toutefois, même si une analyse économique détaillée n'a pas été réalisée dans le cadre de ce travail, les besoins en énergie montrent que la valorisation de la lignine comme co-produit reste

indispensable à la rentabilité de tout procédé d'un prétraitement Organosolv, quel que soit le solvant.

Conclusion générale

Ces travaux ont permis de développer un procédé capable de produire du bioéthanol dans une usine de type bioraffinerie forestière. Une étude complète, à partir d'une matière première régionale et gardant à l'esprit la faisabilité technologique et économique, a été réalisée. Cette étude inclut les différentes stratégies de caractérisation de la matière lignocellulosique, d'extraction des fractions cellulosiques et hémicelluloses, ainsi que l'étape d'hydrolyse et de fermentation des hydrolysats les plus prometteurs en éthanol. Une étude de modélisation décrivant l'ensemble des opérations d'une bioraffinerie forestière, dont la récupération du solvant et la purification de l'éthanol, a permis de proposer une analyse des bilans matière et énergie, ainsi qu'une intégration énergétique du procédé en se fondant sur les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse.

Caractérisation de la matière première

La composition de la matière première, une sciure correspondant à un mélange de quatre espèces de résineux, a été déterminée (44,3 % cellulose, 25,6 % d'hémicelluloses et 26 % de lignine). Les données obtenues correspondent effectivement à une moyenne entre les valeurs individuelles des quatre espèces étudiées.

Prétraitement Organolsov

Les essais préliminaires ont permis de déterminer une granulométrie optimale pour la sciure qui correspond à une taille moyenne de 0,5 mm. Les essais de prétraitement ont porté sur les gammes suivantes : 175–190 °C ; rapport éthanol/eau de 40/60 à 80/20 ; concentration en H_2SO_4 de 0 % à 1 %. Ils ont permis de montrer que :

- le prétraitement permet effectivement de récupérer un solide riche en cellulose et une solution riche en lignine solubilisée qu'il est ensuite possible de récupérer par précipitation dans l'eau ;
- la présence d'acide sulfurique (H_2SO_4) en tant que catalyseur est absolument nécessaire à la délignification ;
- il existe une concentration optimale en catalyseur, voisine de 0,25 % p/p, car un excès d'acide dégrade à la fois la lignine et la cellulose, mais favorise aussi la formation des inhibiteurs de fermentation ;
- l'augmentation de la température favorise la délignification, mais qu'elle dégrade aussi la

cellulose et favorise la formation d'inhibiteurs ;

— l'accroissement de la teneur du solvant en éthanol réduit la formation des inhibiteurs et favorise la délignification jusqu'à atteindre un plateau pour un rapport éthanol/eau de 60/40 ; augmenter ce rapport peut cependant encore améliorer la récupération de la lignine.

Les résultats optimaux qui ont été atteints correspondent à un rapport 60/40 pour le mélange éthanol/eau, à la température minimale de traitement de 175 °C et à 0,25 % de H_2SO_4 ; dans ces conditions, le taux de récupération de la cellulose a atteint 82 % ± 3 % avec une pureté de la cellulose de 71 % ± 3 % et un rendement de récupération de la lignine solubilisée de 45 ± 1 % (pourcentages exprimés en masse de la matière sèche).

Hydrolyse enzymatique

Les essais préliminaires sur les cocktails d'enzymes ont permis de sélectionner le produit commercial Cellic® Ctec2 (Novozymes) par comparaison, sachant qu'il n'existe à ce jour aucun moyen de prédire *a priori* quel cocktail enzymatique sera le plus performant pour un substrat donné. Le cocktail a été appliqué au produit issu du prétraitement optimal (71 % p/p de cellulose) après lavage pour éliminer l'éthanol, avec ou sans étape de séchage. Les résultats ont montré que le séchage ralentit la cinétique d'hydrolyse, sans doute parce qu'il entraîne une contraction de la porosité du substrat solide ; cette conclusion a permis d'éliminer une étape intermédiaire coûteuse de séchage. Les essais préliminaires ont également permis de définir un compromis entre coût et efficacité sur la concentration en enzymes : la valeur de 50 FPU/g de solide a été retenue. Pour la taille du substrat solide, si une réduction de taille s'accompagne d'une accélération de l'hydrolyse, le choix s'est porté sur une étape de broyage donnant une taille similaire à celle des sciures (0,5 mm) afin d'éviter un broyage trop coûteux. Les essais d'hydrolyse enzymatique ont ensuite été menés pour des teneurs en substrat de 15 à 52 g/L, puis après changement d'échelle à 72 g/L, ce qui a permis d'atteindre des taux de conversion de la cellulose en glucose de 57 à 84 % après 12 jours. En revanche, si de bons rendements de saccharification ont pu être atteints, l'hydrolyse enzymatique est l'étape cinétiquement limitante car sa durée est de 12 jours. Les résultats cinétiques ont également démontré qu'au-delà de 32 g/L, la vitesse de saccharification devient indépendante de la teneur initiale en substrat. Un modèle numérique couplant adsorption (isotherme de Langmuir) et réaction enzymatique (cinétique michaelienne) a été développé et a permis de simuler les données expérimentales. Si dans la gamme de concentrations étudiée, le transfert de matière n'est pas limitant, il est clair que travailler à des concentrations plus élevées conduira à des niveaux de viscosité pour lesquelles un mélange plus efficace sera nécessaire, ce qui implique la mise en œuvre de technologies plus performantes.

Fermentation alcoolique

Les essais d'hydrolyse ont été suivis par des essais de fermentation des hydrolysats obtenues par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats de fermentation ont démontré que l'on obtient environ 80 % du rendement maximal en éthanol en moins de 8 heures et donc qu'il n'y a pas

d'inhibition marquée due à la présence potentielle de substance non-glucidique. La fermentation est donc très rapide par rapport à l'hydrolyse.

Modélisation et simulation

Enfin, les résultats obtenus au niveau de la modélisation et simulation de procédé ont permis d'analyser un scénario démontrant la faisabilité du concept d'une bioraffinerie de taille industrielle traitant 70 088 tonnes de biomasse/an, avec une capacité de production d'environ 12 000 tonnes d'éthanol/an. Dans ce scénario, le glucose (issu de l'hydrolyse de la cellulose) et le xylose (issu de l'hydrolyse des hémicelluloses) sont fermentés en éthanol en utilisant une souche *Saccharomyces cerevisiae*. Ce scénario a été modélisé à l'aide du logiciel ProsimPlus. La simulation des différents processus a fourni les bilans matière et énergie sur toutes les opérations unitaires, en particulier sur le recyclage du solvant, la gestion de l'eau de procédé, la purification de l'éthanol, ainsi que sur les besoins en utilités froides et chaudes. Les simulations ont montré que le procédé proposé est économe en eau et en solvant par rapport aux procédés classiques (4,8 L d'eau/L d'éthanol ; 99 % de récupération de l'éthanol du solvant), mais au prix de besoins accrus en énergie (respectivement 10,9 and 8,6 kWh/L d'éthanol pour les utilités chaudes et froides). Ces valeurs sont en bon accord avec les autres travaux publiés sur les procédés Organosolv. Pour l'intégration énergétique du procédé, les écorces, riches en lignine et pauvres en cellulose ont été proposées comme source d'énergie renouvelable. Toutefois, même si une analyse économique détaillée n'a pas été réalisée dans le cadre de ce travail, les besoins en énergie montrent que la valorisation de la lignine comme co-produit reste indispensable à la rentabilité de tout procédé de prétraitement Organosolv.

Bilan global

L'ensemble des travaux réalisés a permis d'atteindre l'essentiel des objectifs visés. Tout d'abord, la faisabilité d'un prétraitement sur une ressource régionale multi-espèces a été démontrée ; de plus, des conditions de prétraitement Organosolv ont été obtenues avec un solvant éthanol/eau qui utilise une fraction du bioéthanol produit pour la délignification, ce qui réduit les besoins en intrants chimiques. Un produit solide riche en cellulose a pu être obtenu, tandis qu'une fraction significative du principal co-produit, la lignine, a pu être récupérée sous la forme de lignosulfonates pour une valorisation ultérieure dans le domaine des matériaux biosourcés dans le cadre d'un autre doctorat du programme. Ensuite, les travaux ont permis de démontrer la faisabilité du procédé jusqu'à la production de bioéthanol, tout en mettant en évidence les verrous économiques liés à la production de bioéthanol de 2ème génération à partir de déchets bois, comme par exemple la durée de l'hydrolyse enzymatique qui est beaucoup plus longue que pour des biomasses de 1ère génération, voire des biomasses de 2ème génération moins riches en lignine (rafles de maïs...). La valorisation de la lignine sous la forme de produits à forte valeur ajoutée apparaît donc l'une des seules voies possibles pour atteindre un équilibre économique du procédé. La production de xylitol à partir du xylose plutôt que sa conversion en éthanol apparaît également comme une alternative.

Perspectives

Du point de vue des perspectives, il est clair qu'une optimisation plus poussée des conditions opératoires et des technologies du procédé est encore nécessaire. Les deux pistes principales résident d'une part dans une diminution de la durée et de la température du prétraitement afin de réduire son coût énergétique, et d'autre part dans la recherche de cocktails enzymatiques encore plus efficaces afin de réduire la durée de l'opération. Dans le cas du prétraitement, il est également clair que le changement d'échelle constitue à la fois un challenge et une opportunité car si les transferts thermiques et la mise sous pression sont plus complexes à réaliser, des technologies alternatives performantes n'existant pas à petite échelle peuvent devenir accessibles. Enfin, une analyse techno-économique détaillée qui prendra en compte ces technologies reste une étape indispensable et elle devra faire l'objet d'une étude dédiée dans le futur.

Résumé

Dans un contexte de transition énergétique et de lutte contre le dérèglement climatique, la production de bioéthanol de 2ème génération est reconnue comme une voie prometteuse pour réduire notre dépendance aux combustibles fossiles.
Ce travail porte sur l'étude de la faisabilité de la production de bioéthanol de 2ème génération à partir d'un substrat végétal de type « déchet bois », constitué de sciure récupérée auprès d'une scierie locale. Cette sciure est un mélange de quatre espèces de bois de types résineux, représentatives des essences locales. L'analyse chimique de ce déchet a montré qu'il contient environ 70 % (g/g) de source potentielle de sucres sous forme de cellulose et d'hémicelluloses exploitables pour la production d'éthanol de 2ème génération par voie biochimique qui fait intervenir trois étapes clés : une étape de prétraitement, une d'hydrolyse enzymatique ou chimique, enfin, une étape de fermentation.
L'étape de prétraitement choisie dans ce travail repose sur une méthode Organosolv avec chauffage par micro-ondes. Ce procédé utilise un solvant organique pur ou dilué, additionné d'un catalyseur pour éliminer la lignine tout en favorisant la récupération de la cellulose et des hémicelluloses et en limitant la formation d'inhibiteurs. La lignine, coproduit du fractionnement, peut être valorisée par ailleurs. Des paramètres tels que la concentration en acide sulfurique (H_2SO_4) en qualité de catalyseur, le rapport éthanol/eau dans le solvant d'extraction, la température et la pression de traitement appliquées ont été étudiés pour optimiser le fractionnement du bois, le rendement et la pureté de la cellulose, la récupération de la lignine et l'absence de formation d'inhibiteurs. Pour le prétraitement, les conditions optimales qui ont été obtenues expérimentalement sur la sciure sont les suivantes : un rapport éthanol/eau de 60/40 avec 0,25 % de H_2SO_4 pour une extraction d'une heure à 175 °C. Ces conditions ont permis d'éliminer 50 % de la lignine tout en préservant 82 ± 3 % de la cellulose initiale avec une pureté de 71 ± 3 %. Ensuite, l'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité a été conduite dans des conditions optimales par un cocktail d'enzymes Cellic® Ctec2, (Novozymes, Danemark) à 50 °C et sous agitation (180 trs./min), ce qui a permis d'atteindre un taux de conversion de la cellulose en glucose de 80 % après 12 jours. Enfin, après enrichissement de l'hydrolysat obtenu, la fermentation de celui-ci par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* a conduit à l'obtention d'un rendement de fermentation alcoolique proche de 80 % du rendement théorique, ce qui semble cohérent avec l'absence d'inhibiteurs observée durant les différentes étapes.
Les simulations de procédé à l'échelle de la bioraffinerie ont montré que 70 088 tonnes/an de

biomasse humide pouvaient être converties en 11 400 tonnes/an d'éthanol en minimisant les besoins en eau et en éthanol (respectivement 4,8 litres d'eau par litre d'éthanol et 99 % de taux de récupération de l'éthanol), au prix de besoins plus élevés en énergie (respectivement 10,9 and 8,6 kWh/L d'éthanol pour les utilités chaudes et froides) que pour les prétraitements en phase aqueuse.

Abstract

In a context of energy transition and the fight against climate change, 2nd generation bioethanol production is recognized as a promising way to reduce our dependence on fossil fuels.
The objective of this study is to analyze the feasibility of 2nd generation bioethanol production from a "wood waste" type of wood substrate, consisting of sawdust obtained from a local sawmill. This sawdust is a mixture of four types of softwood species, representative of local species. Chemical analysis of this waste has shown that it contains approximately 70% (g/g) of potential sugar source in the form of cellulose and hemicelluloses exploitable for the production of 2nd generation ethanol by biochemical route. which involves three key stages : a pretreatment stage, an enzymatic or chemical hydrolysis, and finally a fermentation stage.
The pretreatment step selected in this work is based on an Organosolv method. This process uses a pure or diluted organic solvent, added with a catalyst to remove lignin while promoting the recovery of cellulose and hemicelluloses and limiting the formation of inhibitors. Lignin as a co-product of fractionation can be valued elsewhere. Parameters such as the concentration of sulfuric acid (H_2SO_4) as a catalyst, the ethanol/water ratio in the extraction solvent, the treatment temperature, and the applied pressure were studied to optimize the fractionation of the wood, the yield and the purity of the cellulose, the recovery of the lignin and the absence of formation of inhibitors. For the pretreatment, the optimal conditions obtained experimentally on sawdust are as follows : an ethanol/ water ratio of 60/40 with 0.25% H_2SO_4 for one hour extraction at 175 °C. These conditions made it possible to eliminate 50% of the lignin while preserving 82 ± 3% of the initial cellulose with a purity of 71 ± 3%. Next, the enzymatic hydrolysis of the pretreated substrate under the optimal conditions by an enzyme cocktail (Cellic® Ctec2, Novozymes, Denmark) at 50 °C with shaking (180 rpm) achieved a conversion of cellulose to glucose of 80% after 12 days. Finally, fermentation of the glucosidic hydrolyzate by a strain of *Saccharomyces cerevisiae* led to obtaining an alcoholic fermentation yield close to 80% of the theoretical yield, which seems consistent with the absence of inhibiting compounds observed during the fermentation step.
Process simulations at the biorefinery scale showed that que 70,088 tons/year of wet biomass could be converted into 11,400 tons/year of ethanol, enhancing water and ethanol savings (4.8 L water per L ethanol, and 99 % ethanol recovery, respectively), at the expense of higher energy requitements (10.9 and 8.6 kWh/L ethanol for hot and cold utilities, respectively) than in preatretments in aqueous phase.