



**HAL**  
open science

# Développement d'un procédé de dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique mettant en œuvre des moyens thermo-mécano-chimiques

Monica Fong Lopez

## ► To cite this version:

Monica Fong Lopez. Développement d'un procédé de dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique mettant en œuvre des moyens thermo-mécano-chimiques. Chimie organique. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2019. Français. NNT : 2019INPT0060 . tel-04167765

**HAL Id: tel-04167765**

**<https://theses.hal.science/tel-04167765>**

Submitted on 21 Jul 2023

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

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



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Chimie Biologie Sante

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme MONICA FONG LOPEZ

le mardi 10 septembre 2019

**Titre :**

Développement d'un procédé de dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique mettant en œuvre des moyens thermo-mécano-chimiques

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle ( LCA)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. LUC RIGAL

MME VIRGINIE VANDENBOSSCHE

**Rapporteurs :**

M. EULOGIO CASTRO, UNIVERSITE DE JAEN

Mme ANNE-SYLVIE TIXIER, UNIVERSITE D'AVIGNON

**Membre(s) du jury :**

M. CHRISTOPHE GOURDON, TOULOUSE INP, Président

M. CHRISTOPHE TRIQUENAU, Société Maguin, Invité

M. LUC RIGAL, TOULOUSE INP, Membre

Mme VIRGINIE VANDENBOSSCHE, TOULOUSE INP, Invité





# Remerciements



Je voudrais remercier M. GOURDON d'avoir accepté d'examiner et de présider ce jury de thèse, et Mme TIXIER et M. CASTRO pour leur travail comme rapporteurs, mais aussi pour leur compréhension et disponibilité. Vos commentaires et recommandations ont été importants pour l'enrichissement de ce manuscrit et dans ma réflexion scientifique.

Je remercie mes directeurs de thèse M. Luc RIGAL et Mme Virginie VANDENBOSSCHE pour l'opportunité de mener ces travaux au sein du laboratoire.

Je tiens aussi à remercier M. VILAREM, pour cette opportunité mais aussi pour son accompagnement au cours de ces années comme directeur du laboratoire.

Mes remerciements vont aussi aux membres du projet BABET REAL 5, les réunions de projet ainsi que les repas et discussions qu'on a pu partager ont toujours été un plaisir. Tout particulièrement, je suis reconnaissante aux collègues de l'INSAT pour les travaux qu'on a réalisés en étroite collaboration. Merci Arnaud pour l'accompagnement des expériences de fermentation et pour tout l'aide fournie au cours de ces années.

Je souhaite remercier également au personnel du laboratoire pour leur coopération au cours de ce temps passé à leurs côtés. Un grand merci à M. ARMENGAU, M. Matthieu RIGAL, M. TAPIA, Mme LUNG, M. Nguyen et M. DUDA pour votre soutien et pour ces moments sympathiques passés entre les paillasses, extrudeurs et HPLCs.

Mille mercis aux doctorants et docteurs : Francisco, Jesús, Lucero, Nydia, Lauren, Lilia, Pablo, Marco, Magno, Ivonne, Christopher, Huy, Étienne, Mathieu, Alejandra, Clément, Niki, Alex, Düaa et Sidrine. Les mots ne suffisent pas pour vous remercier pour votre soutien, les rires et tant de moments qu'on a partagé entre bureaux et en dehors. Faire votre rencontre fut un vrai cadeau et je garderai toujours votre amitié proche de mon cœur. Également, je remercie Caro pour son amitié qui s'est formée au cours de cette thèse.

Je suis profondément reconnaissante envers mes amis de longue date : Lucie, Ariane, Aurélien, Paul, Aude, Franck et Rémy, pour leur soutien émotionnel et scientifique. Merci pour toutes ces années d'amitié qui m'ont permis de continuer pendant ces moments difficiles.

Merci à ma famille, mes frères, Mario et Benjamin, pour votre compagnie et vos encouragements. Merci à ma famille en Amérique Centrale, mes parents, Julio et Jeannette, ma grand-mère, Amalia et mes défunts grands parents, Francisca y Carlos, qui sont les piliers de ces travaux. Votre exemple de persévérance et travaille sans relâche m'a servi de modèle pendant toutes ces années loin de vous.

Mon cœur t'est profondément reconnaissant pour ton soutien, ta compagnie et tant de moments qui seront à jamais marqués dans mon esprit, Diego. Gracias, es una palabra muy simple para expresar la gratitud que siento hacia ti, sin tu apoyo, paciencia y amor, estos agradecimientos no serían posibles. J'espère un jour pouvoir te tendre le bras de la même manière que tu l'as fait pour moi.



## Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 1: Etat de l'art.....</b>	<b>21</b>
1.1. Contexte.....	21
1.1.1 Biocombustibles .....	23
1.1.2 Durabilité des biocarburants .....	25
1.1.3 Production de biocarburants de première génération .....	27
1.1.4 Production de biocarburants de deuxième génération .....	27
1.2 Production de bioéthanol.....	28
1.2.1 Production de bioéthanol de 1 <sup>ère</sup> génération.....	30
1.2.2 Biomasse lignocellulosique et bioéthanol.....	31
1.3 Structure et composition de la biomasse lignocellulosique.....	39
1.3.1 Structure de la paroi végétale .....	39
1.3.2 La cellulose .....	40
1.3.3 Les hémicelluloses .....	42
1.3.4 Les lignines .....	46
1.4 Hydrolyse enzymatique pour la production de bioéthanol .....	48
1.4.1 Enzymes et mécanismes d'action.....	48
1.4.2 Facteurs structuraux influençant l'hydrolyse enzymatique .....	52
1.4.3 Hydrolyse enzymatique à haute consistance .....	57
1.5 Prétraitements de la biomasse lignocellulosique.....	61
1.5.1 Vue globale sur les prétraitements .....	61
1.5.2 L'extrusion bi-vis comme prétraitement de la biomasse lignocellulosique.....	69
1.6 La fermentation .....	80
1.6.1 Fermentation et microorganismes.....	80
1.6.2 Configurations d'hydrolyse et fermentation.....	83
1.7 Conclusion du chapitre.....	88
1.8 Références.....	90
<b>Chapitre 2 : Optimisation du prétraitement alcalin en extrudeur bi-vis .....</b>	<b>105</b>
2.1 Introduction.....	107
2.2 Caractérisation de la matière première : Coproduit de maïs doux (CMD) .....	109
2.2.1 Obtention du co-produit de maïs doux et sa disponibilité.....	109
2.2.2 Caractérisation du coproduit de conserverie de maïs doux.....	111
2.2.3 Mesure d'hydrolysabilité des coproduits de maïs doux.....	113
2.2.4 Granulométrie du lot de CMD 3 .....	115
2.2.5 Conclusion caractérisation du CMD .....	117

2.3 Etude préliminaire : NaOH, KOH et Ca(OH) <sub>2</sub> .....	117
2.3.1 Mise en place du profil de vis.....	117
2.3.2 Etude de l'impact de la nature de l'alcalin .....	119
2.3.3 Etude de l'influence de la température de la charge en alcalin: cas de NaOH et de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	124
2.3.4 Conclusion .....	131
2.4 Optimisation du prétraitement dans le procédé global de transformation du substrat lignocellulosique en éthanol au stade laboratoire.....	131
2.4.1 Etude du prétraitement avec KOH et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	131
2.4.2 Etude du prétraitement avec NaOH et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	151
2.4.3 Eléments de conclusion sur l'orientation du choix de l'alcalin .....	176
2.5 Passage à l'échelle pilote du prétraitement alcalin .....	179
2.5.1 Mise en place des conditions d'extrusion .....	179
2.5.2 Composition de l'extrudat de CMD prétraité obtenu avec l'extrudeur EV53 .....	182
2.5.3 Hydrolyse enzymatique de l'extrudat de CMD obtenus avec l'extrudeur EV53 .....	184
2.5.4 Conclusion .....	185
2.6 Conclusion du chapitre .....	185
2.7 Références.....	187
<b>Chapitre 3 : Etude des facteurs de bioextrusion et de l'hydrolyse enzymatique pour le couplage du prétraitement-saccharification-fermentation .....</b>	<b>191</b>
3.1 Introduction.....	193
3.2 Matériels et méthodes .....	195
3.2.1 Essais de bioextrusion .....	195
3.2.2 Préparation des solutions enzymatiques .....	197
3.2.3 Caractérisation des matières produites .....	198
3.2.4 Saccharification des matières prétraitées.....	198
3.3 Résultats .....	199
3.3.1 Influence des conditions de bioextrusion sur la destructuration de la matière .....	199
3.3.2 Influence des conditions de bioextrusion sur l'hydrolyse enzymatique des bioextrudats.	207
3.3.3 Etude du couplage de la bioextrusion en extrudeur bi-vis avec la saccharification- fermentation des sucres en réacteur agité .....	219
3.4 Conclusion du chapitre .....	233
3.5 Références.....	236
<b>Chapitre 4 : Matériels et méthodes .....</b>	<b>239</b>
4.1 Matériel .....	241
4.1.1 Co-produit de maïs doux .....	241
4.1.2 Extrudeurs .....	241

4.1.3 Cocktails enzymatiques .....	242
4.1.4 Levure .....	243
4.4.5 Appareillage pour hydrolyses enzymatique .....	243
4.4.6 Bioréacteur échelle pilote .....	245
4.2 Méthodes .....	246
4.2.1 Fractionnement et bioextrusion en extrudeur bi-vis .....	246
4.2.2 Hydrolyses enzymatiques .....	246
4.2.3 SSCF réalisée dans le réacteur de 22L Solaris.....	249
4.2.4 Analyse chromatographiques.....	250
4.2.5 Analyse des extrudats et filtrats.....	250
4.2.6 Analyse des protéines contenus dans les cocktails enzymatiques .....	253
4.2.7 Méthodes de calcul .....	254
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>257</b>
Liste des figures.....	265
Liste des tableaux.....	271



# Introduction générale



## Introduction générale

Dans le contexte général, de raréfaction des ressources fossiles et de demande énergétique croissante, le projet BABET REAL 5 cherche à proposer une alternative de production de biocarburant à l'échelle industrielle. Ce projet est la suite du projet BABETHANOL qui a étudié un concept de prétraitement de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol. Le projet BABETHANOL a abouti au développement d'un procédé continu combinant des actions thermiques mécaniques et enzymatiques nécessaires pour atteindre les actions favorables à la saccharification. Il a conduit au dépôt du brevet : FR2991691 - 2013-12-13 extension WO 2013182827 A1 (BOPI 2013-50) (Vilarem et al., 2013). Le procédé breveté comprend une étape de prétraitement mécanique et chimique en extrusion bi-vis de la matière lignocellulosique, qui conduit à l'obtention d'une matière plus facilement hydrolysable par des enzymes. Une deuxième étape d'imprégnation enzymatique du matériel prétraité, est incluse dans le procédé breveté. Ces deux étapes sont préceptrices du procédé ESC (Extrusion et Saccharification Combinées) qui est développé durant le projet BABET REAL :

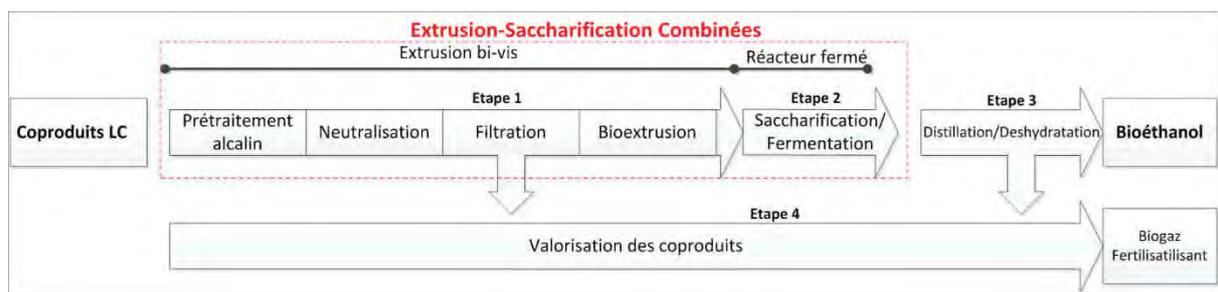


Schéma du procédé global incluant les 4 étapes nécessaires pour la production de bioéthanol, en valorisant les effluents en fertilisant ou biogaz, à partir de résidus lignocellulosiques ; LC: Lignocellulosique

Dans le projet BABETHANOL, une étude économique et environnementale du procédé de production du bioéthanol dans le cas du coproduit de conserverie de maïs doux, a été réalisée par la société MAGUIN. L'évaluation économique des coûts de production s'est appuyée sur les hypothèses suivantes :

- Une capacité de traitement de maïs doux de 30 000t/an, à leur humidité de sortie d'usine (environ 25%), ce qui correspond à la production d'une usine de mise en conserve avec une capacité de traitement de 50-60 000t d'épis en 3 mois (durée de la campagne de production). Le calcul a permis d'estimer à 0,6t/h la production d'éthanol pour 17t/h de coproduit de maïs doux frais.

- Une valorisation intégrée des filtrats de la bioextrusion et des vinasses de fermentation éthanolique. Deux voies ont été envisagées : la valorisation des effluents en fertilisant ou en biogaz par méthanisation. Dans l'optique du premier cas, une réflexion a été menée sur le choix de l'agent alcalin. La soude utilisée pour la mise au point du procédé devra être remplacé par un agent compatible avec l'utilisation souhaitée, tel que la potasse. Dans le deuxième cas, une étude devra être menée sur la digestibilité en conditions anaérobies par des microorganismes méthanogènes.

L'étude du bilan économique du procédé s'est basée sur l'excédent brut d'exploitation (EBITDA), qui correspond à la différence entre les revenus du procédé et le coût opérationnel. Cet indicateur a montré que dans les conditions testées en fin du projet BABETHANOL, le chiffre d'affaire obtenu ne permettait pas de compenser l'amortissement des investissements pour la réalisation des infrastructures. De plus, l'analyse de la répartition des coûts opérationnels indiquait que les coûts d'utilisation des produits chimiques pour le prétraitement et la neutralisation, et des enzymes pour la saccharification étaient les principaux facteurs à réduire pour rendre le procédé viable.

Ainsi, afin d'améliorer le bilan économique du procédé, les orientations suivantes ont été données :

- Nécessité de diminuer la quantité d'agent alcalin utilisé pour l'étape de prétraitement, induisant en parallèle une baisse de la quantité d'acide nécessaire à la neutralisation. Ce poste représentant 44.5% du total des coûts opérationnels.
- Etudier la possibilité de réduire le coût des enzymes ajoutées.
- Augmenter la production d'éthanol. Une hausse de la quantité d'éthanol produit pourrait être atteinte par la co-fermentation des C6 et des C5. Théoriquement dans le cas du maïs, le gain de production de bioéthanol serait de 39%, ce qui correspondrait à un revenu supplémentaire de 9%.

De plus, l'analyse de cycle de vie menée par la société APYGEC sur la base des résultats de MAGUIN a permis de calculer l'efficacité énergétique du procédé, calculé par le ratio  $MJ_{\text{consommés}}/MJ_{\text{produites}}$ . Cet indicateur pourrait passer de 0.44 à 0.21 par la valorisation de la production de fertilisant et de méthane. D'un autre côté, l'analyse de l'empreinte carbone a été déterminée avec une valeur de 0.382  $Kg_{CO_2}$  eq par MJ produite. Elle pourrait être réduite à 0.059  $Kg_{CO_2}$  eq par MJ produite avec la valorisation des coproduits du procédé. L'empreinte carbone du bioéthanol de première génération est de 0.044  $Kg_{CO_2}$  eq par MJ produite, d'où l'importance d'améliorer les performances du procédé et de trouver des informations fiables concernant l'empreinte carbone des produits utilisés.

Le projet BABET REAL 5 a pour objectif de poursuivre le développement du procédé mis en place lors du projet BABETHANOL et d'atteindre le niveau de maturité technologique 5 (TRL5) sur plusieurs cas concrets d'étude. Le projet est financé par le programme HORIZON 2020 de la commission européenne (Grant agreement n° 654365) et regroupe 16 partenaires nationaux et internationaux :

- INPT-ENSIACET (Institut National Polytechnique de Toulouse, Laboratoire de Chimie Agroindustrielle), Toulouse, France
- CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas), Madrid, Espagne
- UNAM (Universidad Autónoma de México), México D.F., México
- INSAT-LISBP (Institut National de Sciences Appliquées de Toulouse, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés), Toulouse, France
- URCA-FARE (Université DE Reims Champagne Ardenne, Fractionnement des Agro-ressources et Environnement), Reims, France
- LNEG (Laboratório Nacional de Energia e Geologia), Lisbonne, Portugal
- SOLAGRO, Toulouse, France
- APYGEC (Adour Pyrénées Garonne Environnement Etude Conseil), Tarbes, France
- CMM (Centro Mario Molina), México D.F., México
- MAGUIN S.A.S, Charmes, France
- ARTERRIS INNOVATION, Toulouse, France
- OVALIE INNOVATION, Auch, France
- WIP Renewable Energies, Munich, Allemagne
- AAU (Aalborg University), Copenhagen, Danemark
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Colonia, Uruguay
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), Buenos Aires, Argentina

Cette thèse s'insère dans le cadre du projet BABET REAL 5, dans le but d'atteindre les objectifs énumérés auparavant.

Le premier chapitre est un état de l'art sur les connaissances relatives à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération à partir de résidus lignocellulosiques. Ainsi dans une première partie, le chapitre s'intéresse particulièrement au contexte actuel et à la place qui est occupée par le bioéthanol comme source d'énergie. Dans un deuxième temps, la structure et la composition de la biomasse lignocellulosique sont présentées afin de montrer quelles sont les spécificités d'un tel type de matière. Par la suite, l'hydrolyse enzymatique et les problématiques liées à celle-ci dans un contexte de production de sucres fermentescibles sont abordées. Le chapitre s'intéresse également aux différents prétraitements de la biomasse lignocellulosique actuellement disponibles pour augmenter l'accessibilité des enzymes à leur substrat, avec un intérêt particulier sur l'utilisation de l'extrusion bi-vis. Dans une dernière partie, les différents enjeux de la fermentation sont évoqués.

Le deuxième chapitre porte sur les études réalisées afin de diminuer les coûts liés aux réactifs employés lors du prétraitement alcalin et la neutralisation en extrudeur bi-vis. Pour cela, la

caractérisation du coproduit de maïs doux, biomasse lignocellulosique modèle choisie pour cette étude, a été réalisée. Il présente, ensuite des essais préliminaires réalisés avec différents types d'agents alcalins en modifiant la charge en alcalin et la température de prétraitement. Le chapitre, s'attarde par la suite sur l'étude de ces 2 facteurs en s'appuyant sur des plans d'expérience réalisés avec KOH et du NaOH, afin de donner des éléments conclusifs sur l'agent alcalin qui est le plus intéressant pour le procédé. En dernier lieu, un essai de prétraitement à échelle pilote en employant les conditions optimisées est présenté.

Le troisième chapitre concerne l'évaluation des paramètres de bioextrusion et l'intégration du procédé de prétraitement-bioextrusion-saccharification/fermentation en continue à l'échelle du laboratoire. Les effets de la modification du ratio liquide/solide et de la charge enzymatique appliquée lors de la phase de bioextrusion sont étudiés pendant cette phase et pendant la saccharification poursuivie dans des réacteurs à petite échelle. Dans une dernière partie, des essais de saccharification et de saccharification-fermentation, menés dans un réacteur de 22L après production du substrat en continue, sont présentés.

Le quatrième chapitre concerne les « matériel et méthodes ». Il regroupe les techniques utilisées pour l'analyse de la matière lignocellulosique, la saccharification à faible et haute consistance et la fermentation.

# Chapitre I : Etat de l'art

Bioéthanol, production et problématiques

## Table des matières

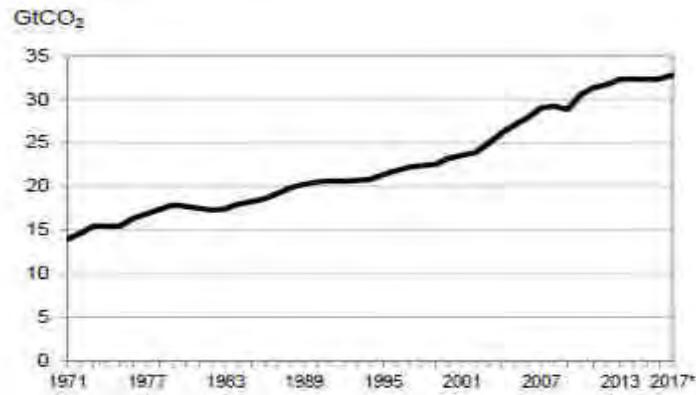
1. Etat de l'art.....	21
1.1. Contexte .....	21
1.1.1 Biocombustibles .....	23
1.1.2 Durabilité des biocarburants .....	25
1.1.3 Production de biocarburants de première génération .....	27
1.1.4. Production de biocarburants de deuxième génération .....	27
1.2 Production de bioéthanol.....	28
1.2.1 Production de bioéthanol de 1 <sup>ère</sup> génération.....	30
1.2.2 Biomasse lignocellulosique et bioéthanol.....	31
1.3 Structure et composition de la biomasse lignocellulosique.....	39
1.3.1 Structure de la paroi végétale .....	39
1.3.2 La cellulose .....	40
1.3.3 Les hémicelluloses .....	42
1.3.4 Les lignines.....	46
1.4 Hydrolyse enzymatique pour la production de bioéthanol .....	48
1.4.1 Enzymes et mécanismes d'action.....	48
1.4.2 Facteurs structuraux influençant l'hydrolyse enzymatique .....	52
1.4.3 Hydrolyse enzymatique à haute consistance .....	57
1.5 Prétraitements de la biomasse lignocellulosique.....	61
1.5.1 Vue globale sur les prétraitements .....	61
1.5.2 L'extrusion bi-vis comme prétraitement de la biomasse lignocellulosique.....	69
1.6 La fermentation.....	80
1.6.1 Fermentation et microorganismes.....	80
1.6.2 Configurations d'hydrolyse et fermentation.....	83
1.7 Conclusion du chapitre.....	88
1.8 Références.....	90

# 1. Etat de l'art

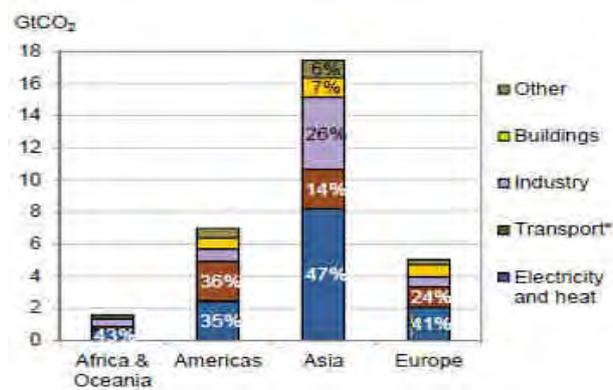
## 1.1. Contexte

Le changement climatique est aujourd'hui une des principales préoccupations mondiales, notamment par l'augmentation de la température globale due aux émissions de gaz à effet de serre d'origine anthropogénique. Il a été ainsi discuté pendant la COP21, qui a eu lieu à Paris en 2015, un engagement des pays membres pour éviter une augmentation de 1,5 à 2,0°C de la température moyenne globale relative au niveau de l'ère préindustrielle (Schleussner et al., 2016). Le changement climatique provoquerait, d'après les prédictions, une augmentation des risques naturels et humains. Parmi les effets sur la nature, il est question d'une élévation du niveau et d'une acidification des océans (C.-T. A. Chen et al., 2017; X. Chen et al., 2017), de modification des écosystèmes (Johnston and Sibly, 2018; White et al., 2018), de la détérioration de la qualité de l'air (Silva et al., 2017) et de la fonte des glaciers ((Pattyn et al., 2018). L'impact sur l'être humain serait à plusieurs échelles ; ainsi par exemple les catastrophes naturelles seraient plus fréquentes et intenses (Hirabayashi et al., 2013; Murakami et al., 2017) provoquant potentiellement des déplacements de population (Black et al., 2013), une diminution des rendements de production agricoles (Challinor et al., 2014), changeant de cette manière l'économie et la société (Chavez et al., 2015; Hallegatte and Rozenberg, 2017; Hirabayashi et al., 2013); des problématiques de santé publique croitraient (MacFadden et al., 2018; Smith and Myers, 2018; West et al., 2013).

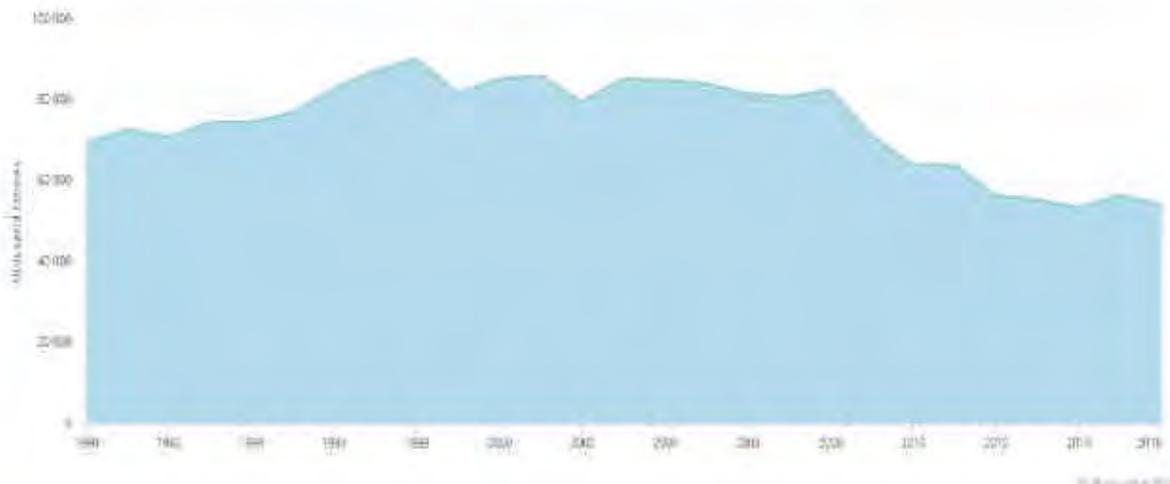
Avec la prise de conscience des nombreuses conséquences néfastes engendrées par l'augmentation de la température globale, la production et l'utilisation de carburants fossiles est remise en question. La production de CO<sub>2</sub> globale liée à la combustion de carburants fossiles ne cesse d'augmenter depuis des décennies (**Figure 1.1**). En Europe, 24% des émissions de CO<sub>2</sub> sont reliées au secteur des transports (**Figure 1.2**). Avec les émissions de gaz à effet de serre, les carburants issus du pétrole, sont aussi à l'origine d'une dépendance de l'Union Européenne aux importations de pétrole provenant des pays fournisseurs. La France, malgré sa diminution ces dernières années, conserve une importation de plus de 50 000 tonnes de pétrole brute par an et une consommation de produits issus du pétrole d'environ 60 000 tonnes par an (**Figure 1.3**).



**Figure 1.1** Emissions de CO<sub>2</sub> provenant de la combustion de carburants fossiles à échelle globale (IEA, 2018)



**Figure 1.2** CO<sub>2</sub> émissions par secteur et par région ; données de 2016 (IEA, 2018)  
\*Transport n'inclut pas les soutes internationales maritimes ni d'aviation

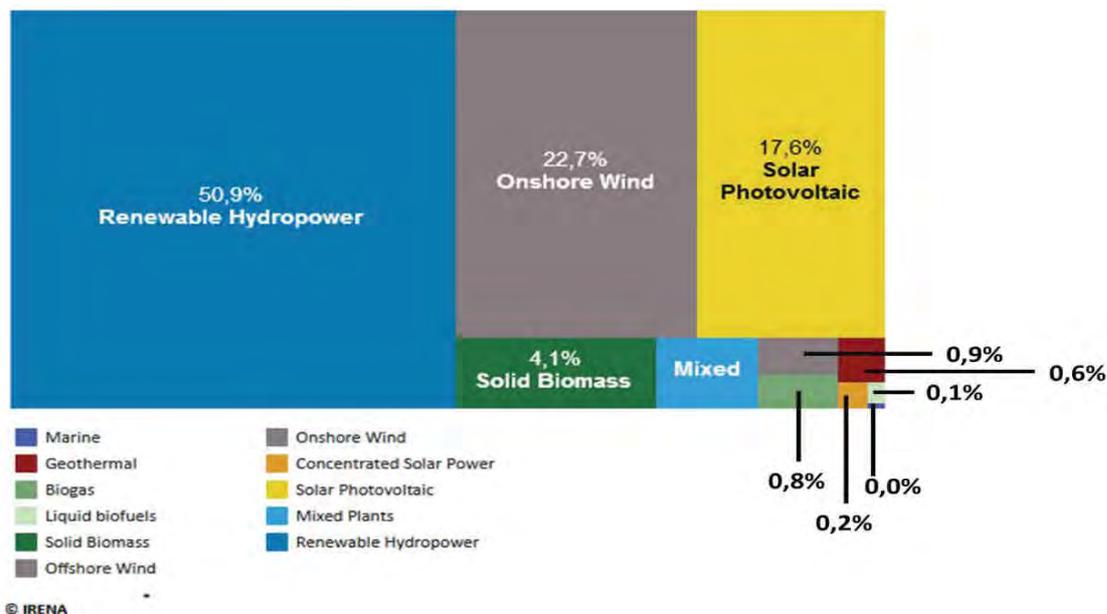


**Figure 1.3** Importation de pétrole brute en France entre 1990 et 2016 en tonnes (IEA, 2018)

Cette consommation de produits pétroliers qui reste aujourd'hui importante, risque dans le futur de ne pas être assurée. Les réserves de pétrole étant de plus en plus difficiles à atteindre, provoqueront ainsi ce qui est appelé dans la littérature : « le pic pétrolier » (Leggett and Ball, 2012). Ce terme réfère au moment où la production de pétrole, après avoir atteint son maximum, déclinera progressivement, ne pouvant pas assumer la demande. De cette manière, le développement d'alternatives renouvelables, locales et avec une empreinte carbone plus faible est un enjeu qui revêt de plus en plus d'importance.

### 1.1.1 Biocarburants

De nombreuses alternatives pour le remplacement des énergies fossiles sont en développement et/ou déjà mises en place, notamment dans le secteur de la production d'énergie électrique, telles que l'énergie hydro-électrique, l'énergie solaire et l'énergie éolienne (**Figure 1.4**). Parmi les énergies renouvelables, les biocarburants constituent une alternative de remplacement de carburants fossiles dans le secteur du transport. De cette manière, l'Union Européenne s'est fixée un objectif d'utilisation de 14% de carburant provenant d'une source renouvelable pour les transports dans chaque pays membre pour 2030 (Giuntoli, 2018).



**Figure 1.4** Capacité d'énergie de production des différentes énergies renouvelables dans le monde en 2017, les pourcentages font référence à la capacité de chacune des technologies en fonction de la capacité totale (IRENA, 2018)

Les biocombustibles font référence aux combustibles obtenus à partir de la biomasse. Ils se trouvent, comme les énergies fossiles sous forme solide, gazeuse et liquide (Guo et al., 2015). La plupart existaient déjà avant l'utilisation des combustibles fossiles. Les biocombustibles solides regroupent le bois de chauffage, les copeaux ou les granulats de bois et charbon, et sont utilisés en combustion directe. Les biocombustibles gazeux sont produits soit par digestion anaérobie de déchets organiques (appelé biogaz) soit par gazéification ou pyrolyse de la matière végétale (appelé syngaz), leur utilisation est surtout dédiée à la production de chaleur et électricité, mais aussi comme combustible pour le transport. Les biocombustibles sous forme liquide, sont quant à eux nombreux et utilisés surtout dans la combustion comme remplaçant de l'essence issue du pétrole.

Les biocarburants liquides sont divisés en plusieurs générations en fonction de la source de laquelle ils sont issus (**Tableau 1.1**) (Oumer et al., 2018). Ainsi, les biocarburants de première génération sont produits en utilisant des matières premières alimentaires telles que l'amidon, le sucre et l'huile végétale ou animale. Les principaux biocarburants de 1G obtenus sont le bioéthanol et le biodiesel par des moyens de production avec relativement peu d'étapes, tels que la fermentation et la transestérification. Les biocarburants de deuxième génération, sont obtenus à partir de matière première non alimentaire, par exemple des résidus agricoles, forestiers, biomasse issue de cultures dédiés, des déchets municipaux ou des huiles usagées. Leur obtention requiert des procédés plus compliqués que pour ceux de première génération et peu de procédés sont arrivés à un niveau technologique de commercialisation. Les biocarburants de troisième génération sont générés à partir d'algues ou autres microorganismes, cette technologie est encore loin d'atteindre une maturité commerciale (Montagne et al., 2013; Shuba and Kifle, 2018).

**Tableau 1.1** Biocarburants liquides en fonctions de la source et du moyen de production (Oumer et al., 2018)

	1 <sup>ère</sup> génération	2 <sup>ème</sup> génération	3 <sup>ème</sup> génération
Source	Produits agricoles destinés à l'alimentation humaine: maïs, blé, canne à sucre, betterave sucrière, graisse animale, huile cuisson, etc.	Produits agricoles non-alimentaires: résidus agricoles, résidus forestiers, cultures dédiées, déchets municipaux	Produits à partir d'algues ou autres microorganismes
Procédé de production	Fermentation de l'amidon ou de mélasse fermentation ABE  Fermentation anaérobie  Transestérification des huiles	Hydrolyse enzymatique et fermentation en éthanol, procédé thermochimique suivie de synthèse	Méthodes thermochimiques et biochimiques
Biocarburant obtenu	Alcools: éthanol, butanol, propanol Biodiesel	Ethanol lignocellulosique, Méthanol, Butanol, Fatty Acid Methyl Ester ,diesel biocarburants Fisher Tropsch	Bioethanol Biodiesel Biohydrogène

### 1.1.2 Durabilité des biocarburants

Le développement des biocarburants, au vu du contexte actuel, doit répondre à différents critères afin d'assurer leur durabilité. Des critères de durabilité ont été évoqués dans la littérature, et rassemblés en trois groupes : sociaux, économiques et environnementaux (Markevičius et al., 2010). Dans les critères sociétaux, des problématiques liées à l'impact de l'implantation de la production des biocarburants sur les terres et les populations sont retrouvées. Les critères économiques se basent sur le respect des conditions de travail et sa viabilité. Finalement, les critères environnementaux sont ceux qui sont les plus critiques lors de l'étude de durabilité et comprennent l'étude des émissions par les gaz à effet de serre, son impact sur les ressources et l'environnement et l'évaluation de ses performances. Dans le but de guider le développement durable des biocombustibles, des principes ont été définies (Solomon, 2010) (**Tableau 1.2**). Des outils dédiés à l'évaluation de la durabilité sont développés tel que l'Analyse de Cycle de Vie (ACV) qui évalue l'impact environnemental. De plus aujourd'hui, la durabilité est un des critères exigés par l'UE au sujet des biocombustibles (Journal

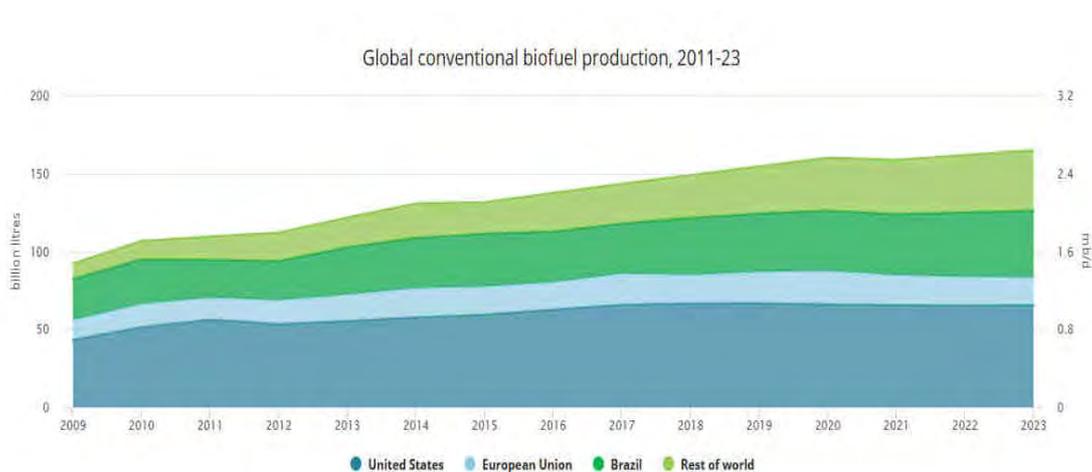
officiel de l'Union européenne, C 160, 19 juin 2010 ) et celle-ci se fait sur la ligne de base de la référence au carburant fossile.

**Tableau 1.2** Principes pour les biocarburants version 0.5 (Solomon, 2010)

<b>Principes</b>	<b>Explication</b>
1. Légalité	Les biocarburants doivent suivre les lois et les réglementations
2. Planification, surveillance et amélioration continue	Les opérations des biocarburants durables doivent être planifiées, implémentées et améliorées à travers une évaluation des impacts environnementaux et sociaux ainsi qu'une étude de viabilité économique transparente et consultable
3. Emissions de gaz à effet de serre	Les biocarburants doivent contribuer à l'allègement du changement climatique en réduisant de façon significative les émissions de gaz à effet de serre comparés à celles obtenues avec les combustibles fossiles
4. Respect des droits de l'Homme et du travailleur	Les biocarburants ne doivent pas enfreindre les droits de l'Homme et du travailleur, et doivent promouvoir le bien-être du travailleur et des conditions de travail décentes
5. Développement rural et sociétal	Dans des régions pauvres, les biocombustibles doivent contribuer au développement social et économique des communautés locales et rurales
6. Assurer la sécurité alimentaire locale	La production de biocarburants doit assurer le droit à des aliments corrects et améliorer la sécurité alimentaire dans des régions où celle-ci est précaire
7. Préservation	La production de biocarburants doit éviter tout impact négatif sur les écosystèmes, la biodiversité et les zones à haute valeur de conservation
8. Sol	La production de biocarburants doit implémenter des pratiques cherchant à conserver la santé des sols et inverser leur dégradation
9. Eau	La production de biocarburants doit maintenir ou améliorer la qualité et la quantité des ressources d'eau à la surface et souterraines et respecter le droit à l'eau
10. Air	La contamination de l'air doit être minimisée tout au long de la chaîne d'approvisionnement
11. Utilisation des outils technologiques, des entrées et gestion des déchets	L'utilisation de technologies doit se faire dans le but de maximiser les rendements de production et améliorer les performances sociales et économiques tout en minimisant les risques sur l'environnement et les personnes
12. Droits des terres	La production des biocarburants doit respecter le droit des terres et les droits d'utilisation des terres

### 1.1.3 Production de biocarburants de première génération

La commercialisation des biocarburants de première génération ou biocarburants conventionnels est déjà mise en place, et il est prévu que sa production augmente (**Figure 1.5**). Les grands producteurs sont le Brésil et les Etats Unis avec la production de bioéthanol à partir de canne à sucre et de maïs, et l'Allemagne et la France avec la production de biodiesel à partir de colza. Une augmentation de la consommation de biocarburants 1G est aussi prévue, des mesures ont été notamment prises afin de promouvoir l'utilisation de bioéthanol dans des mélanges éthanol-essence ou comme éthanol à 100% dans des nombreux pays (Sorda et al., 2010). Cependant, son mode de production engendre des nombreuses problématiques d'ordre éthique et environnemental (Mohr and Raman, 2013). Une attention particulière est portée sur la compétition entre l'utilisation de la terre pour produire des aliments et celle pour produire des combustibles (Tomei and Helliwell, 2016). Mise à part le problème associé à la sécurité alimentaire, il apparait également des problèmes de durabilité liés à l'acquisition de grandes surfaces de terres, au bilan des émissions des gaz à effet de serre et autres conséquences environnementales.



**Figure 1.5** Production et prédiction de biocarburants de première génération conventionnelle par région entre 2009 et 2023 (IEA, 2018)

### 1.1.4. Production de biocarburants de deuxième génération

La production de biocarburants de première génération pose ainsi des problèmes pour assurer sa durabilité, qui sont résolus par le développement des carburants de deuxième génération. Morales et al. (2015) montrent, en se basant sur plusieurs études réalisées à partir de différentes sources lignocellulosiques et en s'appuyant sur l'analyse de cycle de vie, que dans le cas du bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, sa production énergétique atteint un équilibre et présente un impact environnemental plus faible que les carburants fossiles et le bioéthanol de première génération (Morales et al., 2015).

La durabilité et la viabilité économique des biocarburants de deuxième génération sont toutefois aujourd'hui confrontées à des problématiques en termes de disponibilité de la biomasse, de maturité technologique de scale-up et de manque d'investissement (Chandel et al., 2018). Malgré l'allègement de l'impact environnemental dû à l'utilisation de biomasse non alimentaire, des considérations sont à prendre en compte lors de l'utilisation de ces ressources. Dans le cas des résidus agricoles, leur utilisation comme matière première de biocarburants doit prendre en compte leur récupération au champ. L'utilisation des terres se voit de cette manière modifiée et parmi ces variations il y a une diminution des rendements des cultures céréalières, une diminution du N<sub>2</sub>O du sol pouvant entraîner une demande croissante de fertilisants, et une perte du carbone organique des sols qui serait émise sous forme de CO<sub>2</sub> (Cherubini and Ulgiati, 2010).

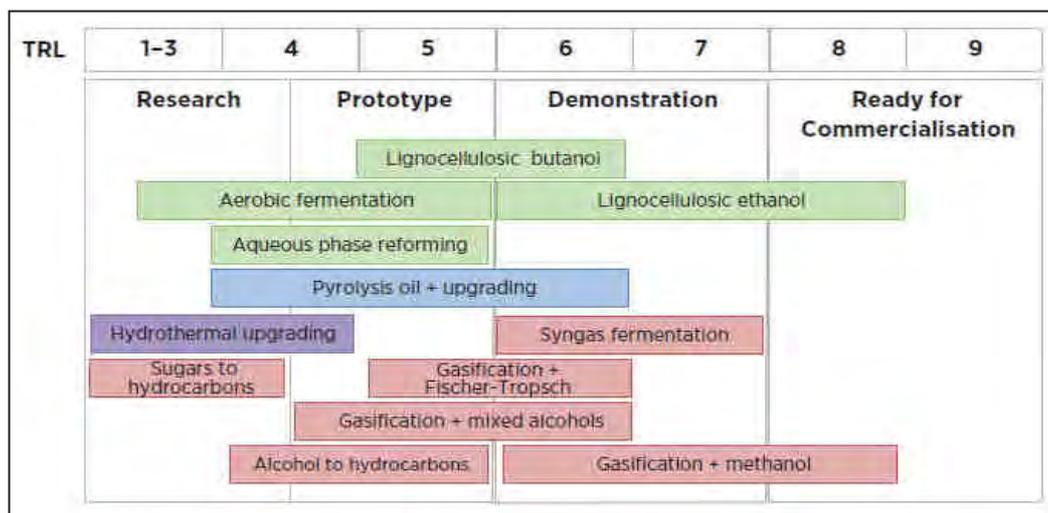
## 1.2 Production de bioéthanol

L'éthanol est un alcool inflammable, volatil, sans couleur, liquide, dont la formule chimique est C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. Son utilisation dans des moteurs date des années 1800 ; notamment Henry Ford a conçu un moteur de tracteur marchant avec de l'éthanol, mais sa commercialisation n'a repris de l'intérêt qu'à partir des années 1980 (Guo et al., 2015). En tant que combustible, il peut être utilisé dans les moteurs à allumage par compression (moteur à diesel) et dans les moteurs à allumage commandé (moteur essence). Sa propriété physico-chimique la plus intéressante est son indice d'octane qui est plus élevé que celui du diesel et de l'essence (**Tableau 1.3**). Un combustible avec un indice octane plus important confère au moteur une meilleure efficacité. De même, la combustion des alcools est moins polluante, d'une part parce que ce sont des composés oxygénés dont la combustion est complète, d'où une diminution des émissions de CO, et d'autre part, lorsqu'il est utilisé comme additif dans des mélanges essence-éthanol, il contribue à la réduction d'émissions des hydrocarbures aromatiques tel que le benzène, et des oxydes d'azote (NOx)(Agarwal, 2007; Yusri et al., 2017).

**Tableau 1.3** Propriétés physico-chimiques du diesel, de l'essence et de l'éthanol (Agarwal, 2007)

Propriété	Unité	Diesel	Essence	Ethanol
Point d'ébullition	°C	180-370	27-225	78
Indice recherche d'octane		20-30	80-99	129
CN		40-55	0-10	5-8
Pouvoir calorifique	MJ/Kg	42.5	42.7	26.9
Chaleur de vaporisation	KJ/Kg	243	349	918.42
Point d'inflammabilité	°C	65-88	-13 à 45	13
Température d'auto-ignition	°C	300	257	420
Ratio stœchiométrique air/combustible		14.3	14.7	9.01

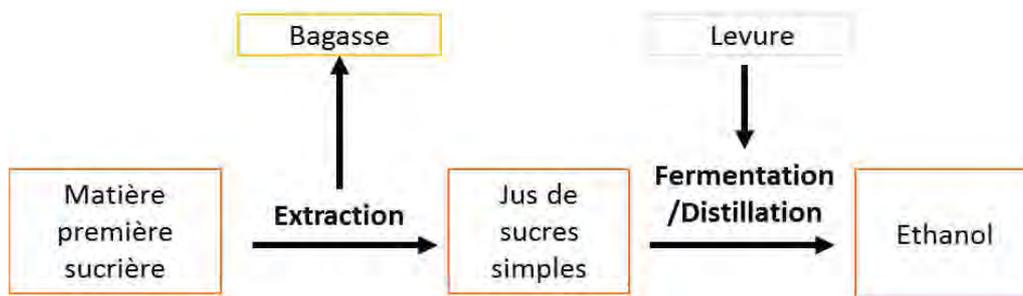
Le bioéthanol peut être produit par fermentation éthanolique des sucres, à partir de quatre sources différentes : des sucres simples, de l'amidon, de la biomasse lignocellulosique et des algues (Zabed et al., 2017). Actuellement les ressources les plus exploitées sont les sucres et l'amidon. Cependant l'exploitation au niveau commercial de la biomasse lignocellulosique a été atteinte, tandis que la production à partir d'algues est encore au stade laboratoire (**Figure 1.6**) (IRENA, 2016).



**Figure 1.6** Niveau technologique de différentes technologies de biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération, les couleurs indiquent les procédés de conversion : hydrolyse (vert), pyrolyse (bleu), hydrothermique (pourpre) et gazéification (rouge) (IRENA, 2016)

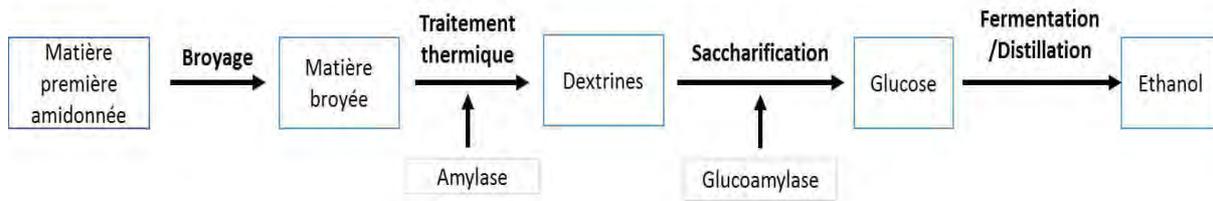
### 1.2.1 Production de bioéthanol de 1<sup>ère</sup> génération

La production de bioéthanol de première génération se fait à partir de sucres (saccharose, glucose et fructose principalement) ou d'amidon. En ce qui concerne les sources de sucre, les matières premières sont les cultures énergétiques telles que la canne à sucre, la betterave sucrière et le sorgho à sucre, les fruits tel que les raisins et les dattes et des déchets de raffinerie de sucre appelées mélasses (Vohra et al., 2014) (Sindhu et al., 2016). La culture de la canne à sucre est principalement retrouvée au Brésil tandis qu'en Europe et particulièrement en France, le bioéthanol se fait à partir de la betterave sucrière. Un avantage de cette ressource est son mode de production puisqu'il nécessite peu d'étapes (**Figure 1.7**) et donc requière moins de coût de production avec lequel il est possible d'atteindre des hauts rendements.



**Figure 1.7** Schéma de la production d'éthanol à partir de matières premières sucrières (Zahed et al., 2017)

L'éthanol produit à partir de ressources amidonnées est obtenu quant à lui à partir de cultures céréalières, de tubercules, de légumineuses ou de certains fruits immatures (Zahed et al., 2017). Parmi les principales matières premières, le maïs est une des ressources les plus importantes au niveau mondiale pour la production de bioéthanol, notamment aux Etats Unis. Pour ce qui est des tubercules, les plus utilisés sont le manioc et la pomme de terre, cette dernière cultivée en Chine représente 20% de la production mondiale. Sa production requière plusieurs étapes dont une première étape de broyage de la matière, suivie d'une liquéfaction avec une amylase thermostable qui permet de décomposer l'amidon en dextrine; afin de récupérer des monomères de glucose à partir de la dextrine, une étape de saccharification par l'intermédiaire d'une glucoamylase est nécessaire et par la suite le glucose est fermenté en éthanol (**Figure 1.8**). Ce type de matière première a comme avantage une grande disponibilité, un rendement éthanolique élevé ainsi qu'une facilité à être stocké pendant de longues périodes de temps.



**Figure 1.8** Schéma de la production d'éthanol à partir de matières premières amidonnées (Zahed et al.,2017)

### 1.2.2 Biomasse lignocellulosique et bioéthanol

Une de sources potentielles de biomasse renouvelable et durable est la biomasse lignocellulosique. La biomasse lignocellulosique se caractérise par sa composition particulière principalement constituée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines et différentes sources sont regroupées dans le **Tableau 1.4**. Depuis de nombreuses années, les différents types de biomasse lignocellulosique ont été étudiés afin de déterminer leur disponibilité, leur potentiel pour obtenir du bioéthanol et leur durabilité économique et environnementale. Un des principaux moteurs pour le développement de cette voie technologique est la disponibilité de la matière lignocellulosique dans le monde puisque c'est une ressource présente ou potentiellement disponible dans tous les coins du monde. De ce fait, la biomasse lignocellulosique est une ressource locale, dont la valorisation peut permettre le développement des zones rurales. En termes de production, la biomasse lignocellulosique peut être produite avec des rendements importants. Selon Kim et Dale (2004), la production de bioéthanol à partir de déchets et résidus agricole pourrait atteindre 491 billions de litres par an ce qui correspond à 16 fois au bioéthanol de première génération produit en 2015.

**Tableau 1.4** Exemples de production de biomasse lignocellulosique par type de biomasse et région (Carroll and Somerville, 2009a; Khoo, 2015)

Biomasse lignocellulosique	Pays/Région	Rendement annuel (t/ha)
Miscanthus	Europe	24,9
Miscanthus	Europe de l'est et Asie centrale	17-26
Miscanthus	USA	30
Switchgrass	USA	12,1
Peuplier	Canada	17,3
Saule	Canada	16,9
Peuplier-Saule	Europe de l'est et Asie centrale	11-18
Résidu de maïs	USA	5,75-10,16
Bagasse de canne à sucre	Brésil	60,11-112,4
Bagasse de canne à sucre	Inde	59,6-102,8
Paille de riz	Chine	3,6-10,0
Rafle de riz	Inde	1,7-2,5
Paille de blé	Angleterre	2,53
Paille d'orge	Angleterre	2,26

### 1.2.2.1 Sources de biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une source de polysaccharides pour la production de bioéthanol par fermentation. Les études sur la production de bioéthanol à partir de différents types de matières premières permettent de distinguer 3 types de biomasse lignocellulosique : les cultures dédiées (plantes pérennes, la biomasse forestière et les plantes aquatiques), les résidus agricoles et forestiers, et les déchets municipaux (**Figure 1.9**) (Wiloso et al., 2012; Zabed et al., 2016). Aujourd'hui, les matières premières présentant un important potentiel pour une valorisation en bioraffinerie sont les cultures dédiées (plantes pérennes et exploitations forestières) et les résidus agricoles, forestiers et industriels (Phitsuwan et al., 2013).

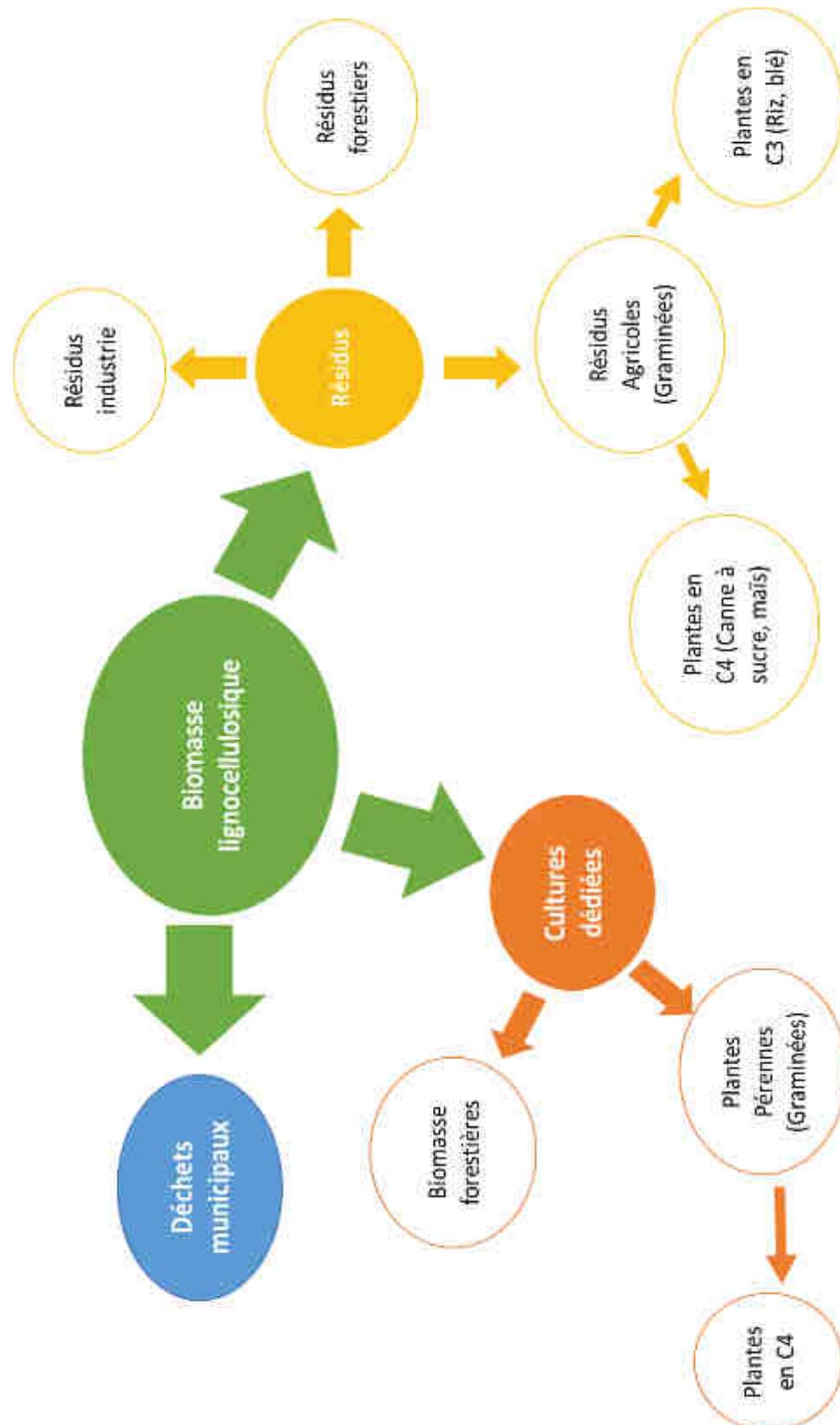


Figure 1.9 Différentes sources de biomasse lignocellulosique (Wiloso et al., 2012 ; Zahed et al., 2016)

Parmi les plantes pérennes les plus étudiées, on retrouve des plantes en C4, telles que le miscanthus et le switchgrass. L'avantage de ce type de plante provient de son mode d'incorporation du CO<sub>2</sub>, permettant d'accumuler 10 à 100 fois plus de CO<sub>2</sub> au niveau de leur site catalytique (Yamori et al., 2014). Les intérêts des plantes en C4 pour la production de bioéthanol ont un rendement en biomasse élevé, une haute teneur en glucanes (**Tableau 1.4 et Tableau 1.5**), une adaptation géographique et climatique large et une bonne efficacité d'assimilation des nutriments et des sources d'azote (Weijde et al., 2013). De la même manière, ce type de biomasse peut être cultivée sur des terres détériorées en évitant la compétition sur l'usage de la terre pour l'énergie et la nourriture (Carroll and Somerville, 2009). Cependant, la production de plantes pérennes de type miscanthus et switchgrass implique un fort investissement initial (coût des terres et des graines adaptées).

D'autres cultures dédiées très étudiées sont les **cultures forestières**, différenciées en 2 types par leur type de graine, les bois tendres et les bois durs, qui sont respectivement des angiospermes et des gymnospermes. Les bois tendres les plus étudiés sont le pin, cèdre, épicéa, cyprès, sapin, douglas et séquoia. Les bois durs les plus communément utilisés sont le peuplier, le saule, le chêne et l'eucalyptus. Ce type de biomasse peut être récolté toute l'année, ce qui élimine la contrainte du stockage. Cependant, elle possède une plus grande fraction ligneuse, la rendant plus récalcitrante aux prétraitements et à l'hydrolyse enzymatique (**Tableau 1.5**). Lors de sa transformation en bioéthanol, sa récalcitrance et sa rigidité structurale induisent des coûts plus importants ; et notamment il sera nécessaire d'utiliser davantage d'énergie pour réduire la taille des particules (Zhu and Pan, 2010).

Parmi la biomasse provenant des **résidus agricoles**, plusieurs types peuvent être distingués: résidus céréaliers, les bagasses et les déchets de transformations agroindustrielle (Ghosh et al., 2017; Ravindran and Jaiswal, 2016; Sindhu et al., 2016; Tye et al., 2016). Les résidus agricoles céréaliers sont le plus souvent issus de cultures récoltées une fois par an, et peuvent donc constituer une biomasse disponible. Lorsqu'elles sont comparées à la biomasse forestière, celle-ci possède une structure plus accessible aux prétraitements, du fait de leur composition faible en lignines (**Tableau 1.5**). Dans la plupart des cas, les résidus agricoles après la récolte sont laissés au sol pour être utilisés comme fertilisant, ou sont utilisés comme aliments pour le bétail. Dans certains cas, les résidus agricoles sont brûlés afin d'être éliminés d'une façon rapide et facile. Cette pratique est responsable d'une importante production de gaz à effets de serre, raison pour laquelle leur revalorisation en bioéthanol serait un moyen écologique de gestion de ces déchets (Hayashi et al., 2014)(Tye et al., 2016).

Un des résidus céréaliers prometteur pour la production de bioéthanol est la paille, avec une production céréalrière de 1000 millions de tonnes annuelles (Sun, 2010). La paille se constitue généralement des tiges, des feuilles et des épillets résiduels après la récolte des graines (Motte et al.,

2014). Dans certains cas, les pailles sont utilisées comme aliment pour le bétail, mais celle-ci reste peu valorisée du fait que les ruminants ne digèrent que 40-50% du matériel digestible. De cette manière, la production d'éthanol à partir de ce type de résidu pourrait constituer une source plus économiquement intéressante.

Un autre type de résidu, très prometteur est la bagasse, notamment la bagasse de canne à sucre qui constitue le résidu le plus abondant dans le monde avec 328 Tg par an dans le monde, et qui est produite dans 200 pays dont notamment le Brésil (Sindhu et al., 2016). Elle est obtenue après pressage et extraction du jus de la canne à sucre. Dans l'industrie du sucre, ce résidu sert principalement à la production de chaleur par combustion dans des chaudières. L'exploitation de la bagasse de canne à sucre pourrait contribuer à la diminution de la production de bioéthanol à partir de jus de canne à sucre, et par ce moyen contribuer à atténuer la concurrence entre les terres utilisées pour la culture énergétique et celles utilisées pour l'alimentaire (Tye et al., 2016).

Une autre source potentielle moins étudiées pour la production de bioéthanol est l'ensemble de déchets de l'industrie alimentaire issus des céréales, des fruits, des légumes, tel que le marc de pomme et les déchets de brasserie (Parmar and Rupasinghe, 2013) (Liguori et al., 2015). Ce sont des déchets dont la composition chimique reste assez uniforme, et leur valorisation est une option pour une meilleure gestion des déchets (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Une des contraintes majeures de l'exploitation des résidus agricoles est leur prélèvement du sol (Lal, 2009). Comme mentionné auparavant, les résidus agricoles sont dans beaucoup de cas laissés au sol pour jouer un rôle de fertilisant. Le prélèvement des résidus agricoles a des conséquences directes et indirectes sur la qualité des sols. Les conséquences directes concernent la résistance des sols puisque le paillis régule l'équilibre de l'eau, l'érosion par la pluie et le vent, le recyclage des nutriments du sol et son utilité comme aliment et habitat pour les microorganismes du sol. Les conséquences indirectes touchent l'altération du microclimat et l'humidité des sols. Déterminer la quantité de résidus disponibles dépend de cette manière du climat, de la rotation des cultures, de la fertilité des sols, des pratiques de labourage et de la pente des sols la terre, d'où la nécessité d'une évaluation au préalable lors de la constitution des cas d'étude.

**Tableau 1.5** Composition de la biomasse lignocellulosique de quelques espèces végétales (Benjamin et al., 2013; Carroll and Somerville, 2009; Cayetano and Kim, 2018; Zhu and Pan, 2010)

Biomasses lignocellulosiques	Composition (%MS)								
	Cendres	Extractibles	Lignine	Arabinan	Galactan	Glucan	Xylan	Mannan	Polysaccharides
<b>Plantes pérennes</b>									
Miscanthus	0,4	1,8	26,2	1,2		43,0	19,8		64,0
Switchgrass	4,0	2,0	24,1	1,5	0,5	42,6	23,1	0,3	68,0
<b>Bois tendres</b>									
Epicéa	0,3	-	28,3	1,4	2,7	43,2	5,7	11,5	64,5
Douglas	0,4	-	32	2,7	4,7	44,	2,8	11,0	65,2
Pin rouge	0,4	-	29,0	2,4	1,8	42,0	9,3	7,4	62,9
<b>Bois durs</b>									
Peuplier	2,03	6,89	25,18	0,89	0,88	39,23	13,07	1,81	55,88
Eucalyptus	1,12	4,2	26,9	0,3	0,7	48,1	10,4	1,3	60,8
<b>Résidus agricoles</b>									
Résidus de maïs	11,0	11,9	18,2	1,9	0,7	30,6	16,0	0,5	49,7
Bagasse de canne à sucre	0,6-3,4	3,5-12,4	14,4-23,1	2,0-4,7		36,2-40,7	18,9-29,1		59,8-71,7
Paille de blé	10,22	12,95	16,9	2,35	0,75	32,64	19,22	0,31	55,27
Paille d'orge	6,8	10,2	15,2	3,7	1,5	39,1	23,8		64,8
Paille de riz	10,8	-	16,9	-	-	35,3	18,5		53,8

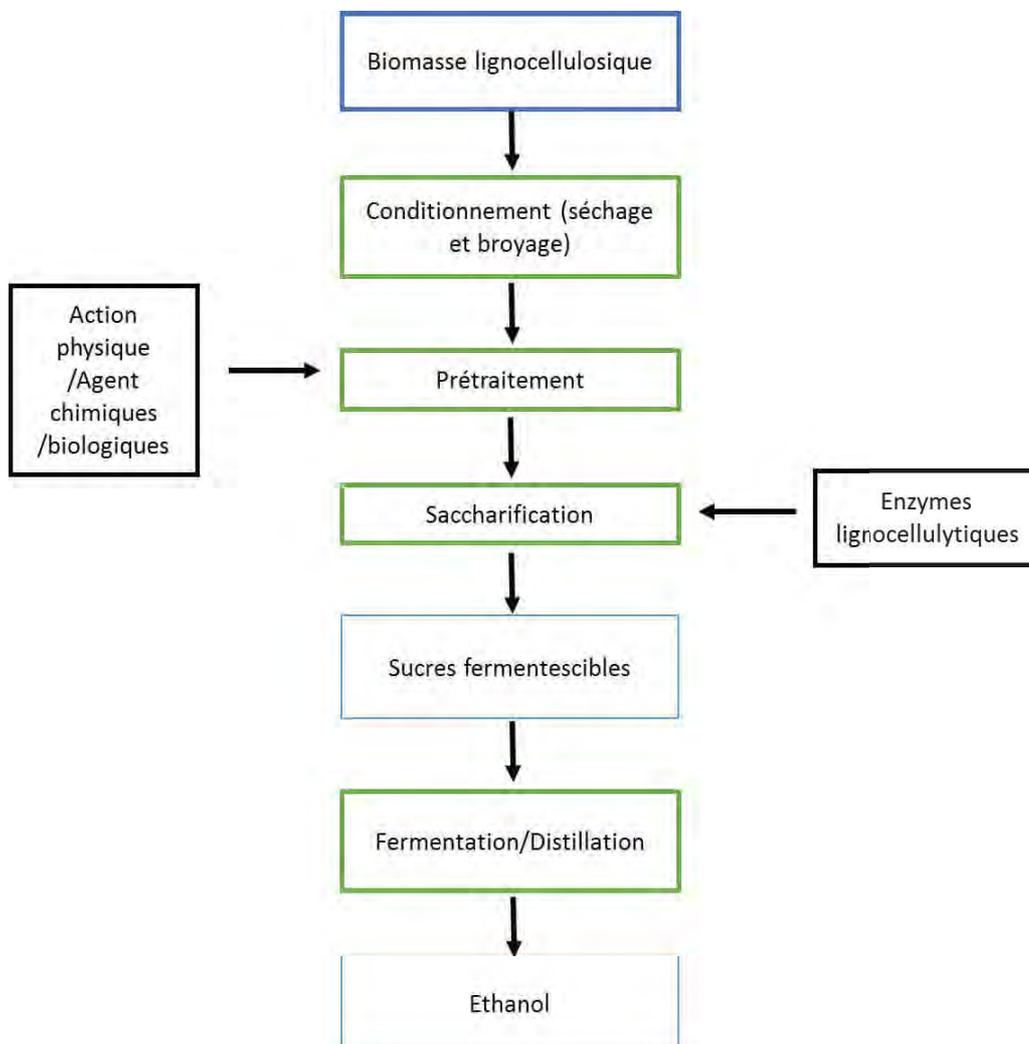
En conclusion, le **Tableau 1.6** et les paragraphes précédents montrent que bien que la biomasse lignocellulosique représente un important potentiel pour la production de bioéthanol, mais qui nécessite d'étudier au préalable la disponibilité de la biomasse, le coût de sa production, sa récolte et son stockage, ainsi que l'impact environnemental lié à son utilisation.

**Tableau 1.6** Tableau récapitulatif des principaux avantages et désavantages pour la production de bioéthanol des principales sources de biomasse lignocellulosique

Type de biomasses lignocellulosiques	Avantages	Désavantages
Plantes pérennes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forts rendements</li> <li>Efficacité hydrique</li> <li>Incorporent plus de CO<sub>2</sub></li> <li>Système racinaire</li> <li>Contribue au control de l'érosion des sols</li> <li>Peu de pertes d'azote</li> <li>Peut-être cultivé dans sur des terres détériorées</li> </ul>	Nécessite un fort investissement
Biomasse forestière	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grande disponibilité dans plusieurs régions du monde</li> <li>Récoltée pendant toute l'année</li> <li>Faible teneur en matière minérale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Importante quantité de lignine et donc forte récalcitrante aux prétraitements</li> <li>Besoin de plus d'énergie pour réduire la taille</li> <li>Déforestation</li> </ul>
Résidus agricoles	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peut être facilement disponible</li> <li>Valorisation écologique des déchets</li> <li>Peut contribuer à minimiser la dépendance aux cultures énergétiques</li> </ul>	Problèmes reliés au prélèvement de la biomasse des sols

### 1.2.2.2 Mode de production du bioéthanol lignocellulosique par voie biochimique

La production de bioéthanol lignocellulosique implique un plus grand nombre d'étapes que celle de 1<sup>ère</sup> génération (**Figure 1.10**). Une première étape de conditionnement est nécessaire dans la plupart de cas afin de pouvoir stocker et réduire la taille de la biomasse. Par la suite la biomasse subit une étape de prétraitement pendant laquelle des agents chimiques, des actions physiques et/ou des agents biologiques agissent sur la biomasse afin de rendre sa structure plus accessible aux enzymes lignocellulytiques pendant l'étape d'hydrolyse des polysaccharides dite de saccharification. A l'issue de l'étape de cette étape, l'action des enzymes permet d'obtenir des sucres fermentescibles don des oligomères ou des monomères de glucose ou de xylose. Les sucres sont ensuite fermentés par des microorganismes (levures ou bactéries) en éthanol. Il s'en suit l'étape de distillation qui permet de récupérer l'éthanol (Zabed et al., 2016)

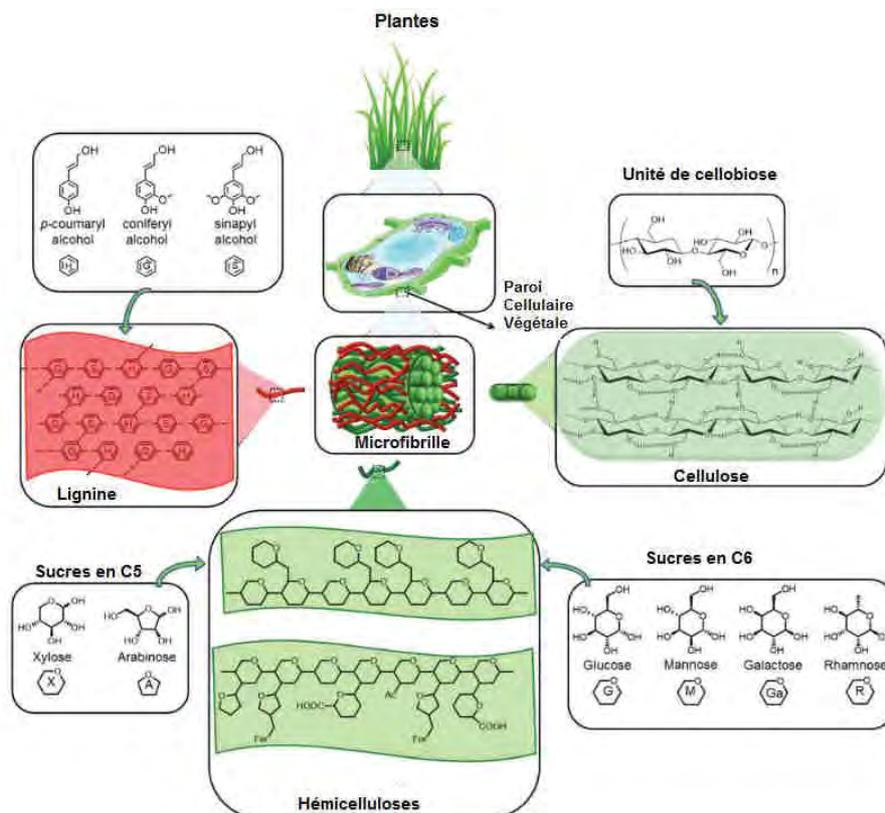


**Figure 1.10** Schéma de production de bioéthanol à partir de biomasses lignocellulosique (Zabed et al. 2016)

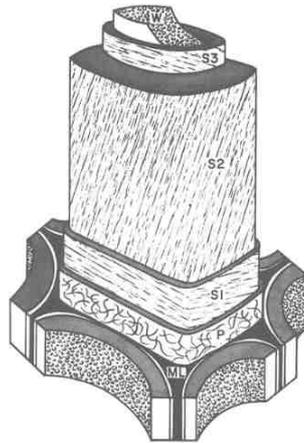
### 1.3 Structure et composition de la biomasse lignocellulosique

#### 1.3.1 Structure de la paroi végétale

Comme évoqué précédemment, de la biomasse lignocellulosique est principalement composée de trois polymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine d'autres composés minoritaires comme des minéraux et ou des composés phénoliques pouvant être présents (**Figure 1.11**) (Isikgor and Becer, 2015). Ces trois composés sont organisés de façon structurée au niveau de la paroi des fibres végétales. La paroi des cellules des fibres végétales est organisée en plusieurs couches : la lamelle moyenne (ML), la paroi primaire (P) et la paroi secondaire (S) (**Figure 1.12**) (Côté, 1977). La lamelle moyenne joue le rôle de colle entre les cellules pour former un tissu. La paroi primaire, est une couche fine composée de cellulose, hémicelluloses, pectine et protéines enrobée de lignine. Au niveau de la paroi secondaire, on retrouve plusieurs couches : une couche extérieure (S1), couche moyenne (S2) et une couche interne (S3). C'est la couche S2 qui forme la plus grande portion de la paroi cellulaire, son épaisseur dépend de l'état de maturation, de l'âge de la plante et de la morphologie dans laquelle se trouve la cellule (Sun, 2010).



**Figure 1.11** Principaux composants et structure de la biomasse lignocellulosique. Gl : acide gluconique; Fer : acide ferulique (Isikgo et Becer, 2015)

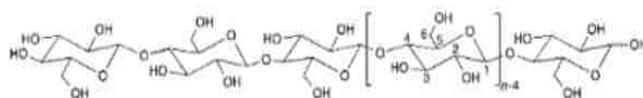


**Figure 1.12** Schéma de l'ultrastructure d'une cellule modèle de bois. Les différentes couches sont : la couche primaire (P), couche secondaire (S), lamelle moyenne (ML). L'orientation des microfibrilles de cellulose est indiquée (Côté, W.A. 1977)

### 1.3.2 La cellulose

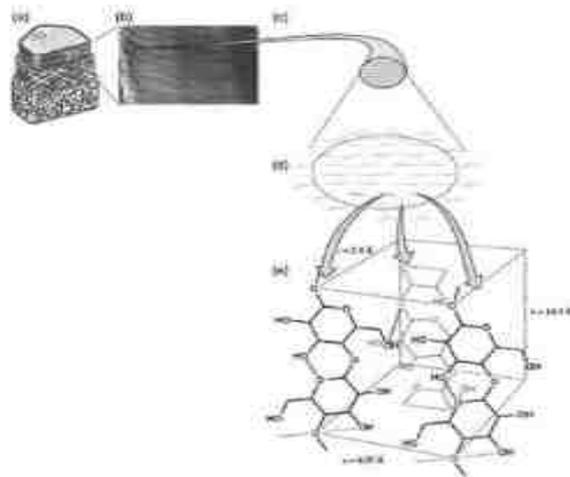
La cellulose est le polymère organique le plus répandu sur terre, présent dans tous les végétaux terrestres, certaines espèces aquatiques telle que les algues, certains animaux invertébrés et les bactéries (Malcolm Brown et al., 1996). Sa production s'élèverait à  $1.5 \times 10^{12}$  tonnes par an (Klemm et al., 2005). Au niveau moléculaire, la cellulose est un homopolymère linéaire d'unités de D-anhydroglucopyranosyl liées en  $\beta$ -1,4 (en anglais AGU de Anhydroglucose Unit) dont le nombre définit son degré de polymérisation (DP). L'AGU est une molécule possédant un cycle pyranose à 5 carbones avec un seul oxygène dans le cycle et un groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$  en substituant du cycle. Les degrés de polymérisation varient de 15 à 15000 résidus (Xu, 2010) liés entre eux par la liaison osidique.

Chaque chaîne de cellulose possède une extrémité réductrice et une extrémité non réductrice qui se termine avec le groupement C4-OH (**Figure 1.13**). De part de sa structure moléculaire, la cellulose est hydrophobe, chirale, dégradable et peut réagir avec des nombreux produits chimiques par son OH réducteur (Klemm et al., 2005). Le motif qui se répète le long de la chaîne est le cellobiose, qui est un dimère de 2 glucopyranoses liés en  $\beta$ -1,4 (Fengel and Wegener, 2011).

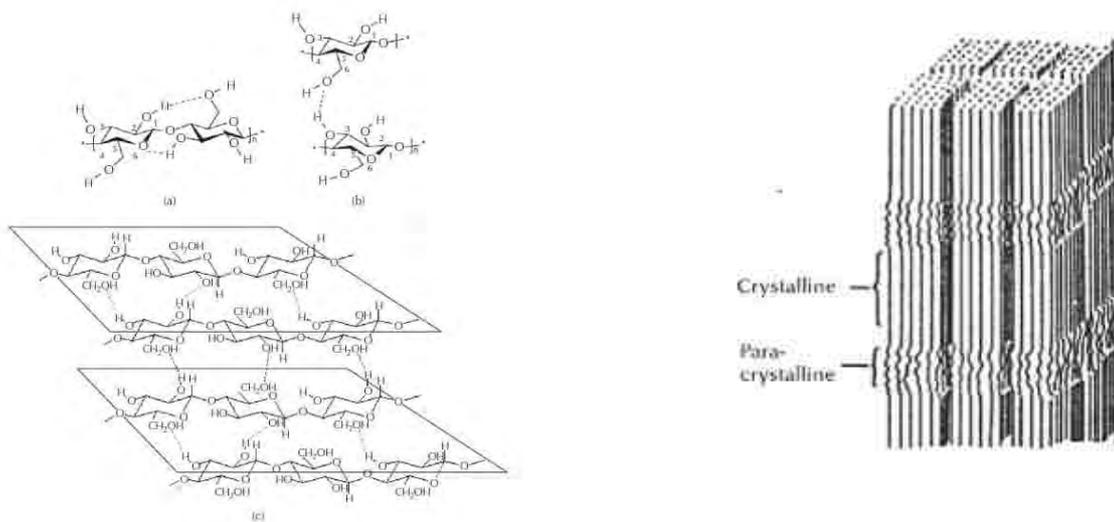


**Figure 1.13** Structure moléculaire de la cellulose ( $n$ = degré de polymérisation (DP))(Klemm et al.,2005)

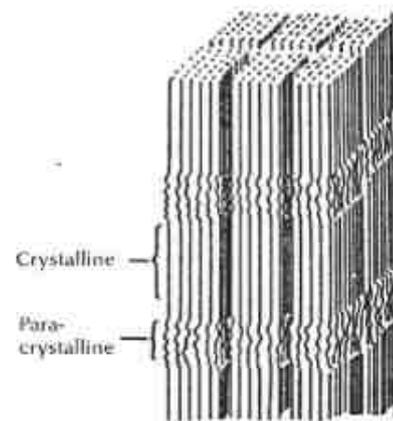
Un certain nombre (18 à 24) de chaînes de (1,4)  $\beta$ -D-glucanes sont assemblées entre elles par des liaisons hydrogène, cette structure définissant microfibrille de cellulose (**Figure 1.14**) (Fernandes et al., 2011; Laureano-Perez et al., 2005). Les chaînes de glucanes organisées sous forme d'hélice, forment un réseau tridimensionnel et cristallin dont la structure est assurée par des forces de Van der Waals (Cousins and Brown, 1997 ; Zugenmaier, 2001)(**Figure 1.15**). Ainsi, les zones où les chaînes de glucanes sont très fortement organisées constituent des zones cristallines, et là où elles le sont moins, des zones amorphes (**Figure 1.16**) (Xu, 2010).



**Figure 1.14** Schéma de l'organisation de la cellulose au sein de la paroi cellulaire végétale (a), la paroi secondaire (b), microfibrille (c), chaînes de glucane (d) et cellobiose (e) (Laureano-Perez et al., 2005 de l'American Society of plant Biology )

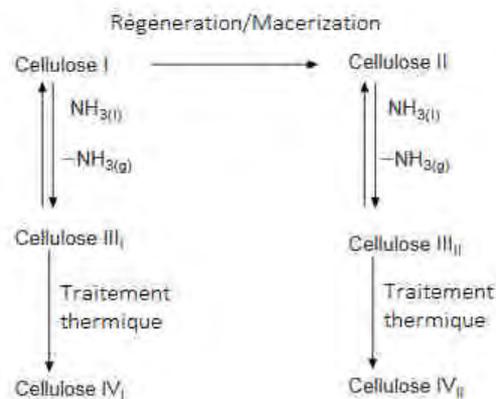


**Figure 1.15** Structure de la cellulose montrant les liaisons hydrogènes intramoléculaires (a et b) et intermoléculaires (c) (H.A. Krassig.,1993)



**Figure 1.16** Microfibrilles contenant environ 15-40 molécules de cellulose séparées par des zones cristallines et para-cristallines ou amorphes (Sun., 2010)

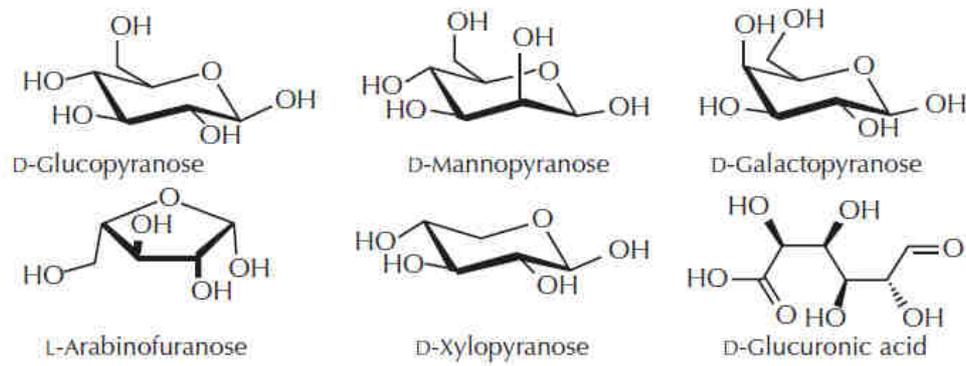
La cristallinité de la cellulose présente à l'état natif forme la cellulose de type I. Elle se trouve sous deux formes  $I_\alpha$  principalement retrouvé chez les algues et les bactéries et  $I_\beta$  retrouvé dans les parois végétales (O'Sullivan, 1997). Le polymorphisme de la cellulose obtenu par rayons X a été documenté et six polymorphes interconvertibles de la cellulose ont été répertoriés (I, II, III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>, IV<sub>I</sub> et IV<sub>II</sub>) (**Figure 1.17**). La cellulose de type II est obtenue par régénération, après solubilisation dans un solvant et précipitation ou macération dans une solution d'hydroxyde sodium concentrée. Les celluloses de type III<sub>I</sub> et III<sub>II</sub> sont obtenues par traitement avec de l'ammonium ou certains amines des celluloses de type I et II respectivement. Finalement, les celluloses de type IV<sub>I</sub> et IV<sub>II</sub> sont obtenues par traitement thermique des celluloses de type III<sub>I</sub> et III<sub>II</sub>, respectivement. Par ailleurs, une caractéristique de la cellulose est l'insolubilité dans l'eau et dans les solvants organiques malgré son caractère amphiphile. Ceci qui a été fortement débattue (Glasser et al., 2012; Medronho et al., 2012). La cellulose ne serait pas dissoute au niveau moléculaire comme tel mais serait dissoute sous forme d'agrégats dans lesquels des centaines de chaînes de cellulose sont présentes. L'hydrophobicité de la cellulose serait ainsi due principalement aux effets ioniques entropiques et aux interactions hydrophobes (Medronho and Lindman, 2014).



**Figure 1.17** Différents traitements d'obtention des polymorphes de cellulose (O'Sullivan, 1997)

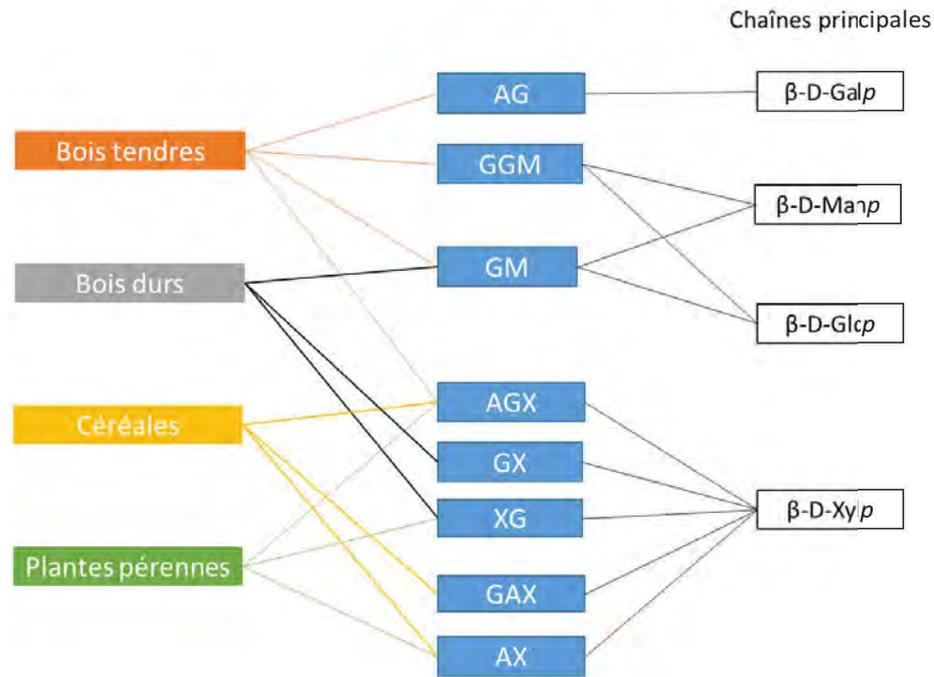
### 1.3.3 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères, qui à la différence de la cellulose sont amorphes et sont souvent constituées de chaînes ramifiées. Le degré de polymérisation des chaînes varie de 40 à 600 résidus. De même, les hémicelluloses sont des polymères plus facilement hydrolysables (Fengel and Wegener, 2011). Parmi ces principaux composants, on retrouve des pentoses ( $\beta$ -D-xylose,  $\alpha$ -D-arabinose), des hexoses ( $\beta$ -mannose,  $\beta$ -D-glucose,  $\alpha$ -D-galactose) et de l'acide uronique ( $\alpha$ -D-acide glucuronique) (Figure 1.18) (Ren and Sun, 2010).

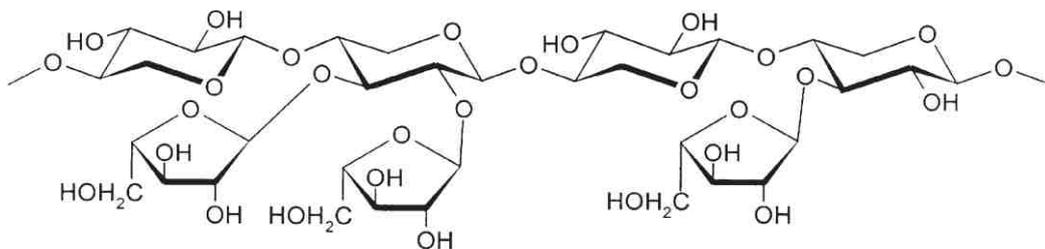


**Figure 1.18** Principaux constituants des hémicelluloses (Ren and Sun, 2010)

La composition de la chaîne principale et des ramifications varie selon le type de biomasse (**Figure 1.19**) (Gírio et al., 2010). De cette manière, dans la biomasse forestière, les ramifications des hémicelluloses se constituent principalement de mannose comme par exemple les glucomannanes ou galactoglucomannes. Les chaînes hémicelluloses les plus retrouvées sont les xylanes qui constituent 20-30% de la paroi secondaire. Les xylanes sont surtout retrouvés chez les graminées. L'arabinoxylane (AX) a été identifié dans nombreuses variétés céréalières, telles que le blé, l'orge, le riz et le maïs. L'AX est constitué d'une chaîne linéaire de xylopyranose substituée d' $\alpha$ -L-Arafuranose. Ce dernier peut aussi porter des acides phénoliques tel que l'acide ferulique et l'acide coumarique (**Figure 1.20**) (Ebringerová et al., 2005). Le nombre de ramifications d'arabinoses sur les chaînes de xylane peut varier selon le type du tissu dans la plante, un exemple en est la composition des hémicelluloses des constituants de la plante de maïs (**Tableau 1.7**)(Cai et al., 2016).



**Figure 1.19** Types d'hémicelluloses et leur chaînes principales, retrouvés dans les différents types de biomasse lignocellulosique ; AG :Arabinogalactane ; GGM : Galactoglucomannane. GM : Glucomannane ; AGX : Arabinoglucuronoxylane ; GX : Glucuronoxylane ; XG : Xyloglucane ; GAX : Glucuronoarabioxylane ; AX : Arabinoxylane (Girio et al., 2010)

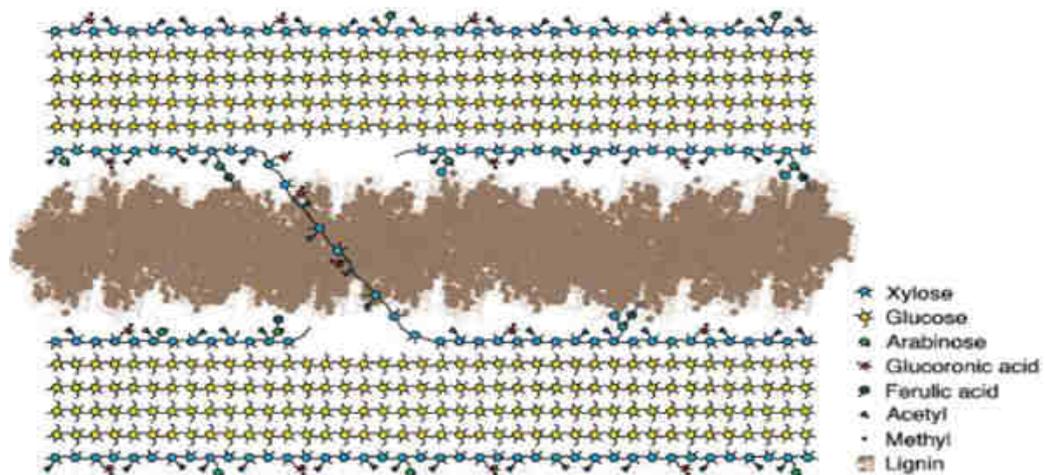


**Figure 1.20** Structure d'un L-arabino-D-xylane soluble (Ebringerová et al., 2005)

**Tableau 1.7** Composition des hémicelluloses de différentes parties issus de maïs dur (Cai et al., 2016)

Composition	Fleur	Feuille	Epi	Rafle	Tige
Xylane (% MS)	28,68	20,17	35,14	26,2	21,37
Arabinane (%MS)	2,91	2,59	3,01	5,1	2,15

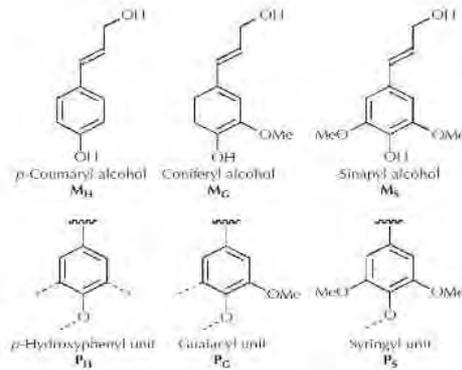
Les hémicelluloses permettent le maintien des fibrilles de cellulose en formant des chaînes longues qui s'associent par des liaisons hydrogènes (Busse-Wicher et al., 2014; Marriott et al., 2016) (**Figure 1.21**). Même si les hémicelluloses sont responsables de la rigidité de la paroi, un rôle de plastifiant leur est attribué, permettant l'extension de la paroi (Marriott et al., 2016). Les hémicelluloses forment aussi des liaisons covalentes avec les lignines (**1.3.4 Les lignines**), ainsi une matrice cellulose-hémicelluloses-lignines est obtenue (Hendriks and Zeeman, 2009).



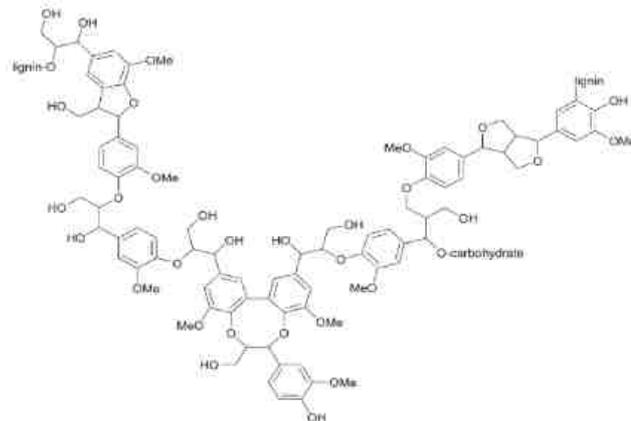
**Figure 1.21** Modèle d'organisation de la paroi végétale des graminées, les molécules d'hémicelluloses (bleu) se lient à des sections du microfibrille de cellulose (en jaune) par des liaisons hydrogènes (Marriott et al., 2016)

### 1.3.4 Les lignines

Les lignines sont des hétéropolymères amorphes composés d'unités de phénylpropanoïdes ou monolignols : *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl (**Figure 1.22**)(Ralph et al., 2004). Le polymère de lignines comporte plusieurs types de liaisons, la plus commune étant la liaison éther en  $\beta$ -O-4 qui mène à une élévation linéaire du polymère. Les liaisons C-O et C-C sont moins présentes (**Figure 1.23**)(Brandt et al., 2013).



**Figure 1.22** Les 3 monolignols primaires des lignines alcool *p*-coumaryl (MH), alcool coniferyl (MG) et alcool sinapyl (MS) et unités au sein de la lignine structurale, unités de *p*-hydroxyphényl (PH), guaiacyl (PG), et syringyl (PS) (Ralph et al., 2004)



**Figure 1.23** Fraction des lignines avec plusieurs liaisons C-O et C-C (Brandt et al., 2013)

La composition des lignines est de nature différente dans les bois tendres, les bois durs et les graminées (**Tableau 1.8**)(Barakat et al., 2014). Les lignines des bois tendres possèdent une composition quasi exclusivement en unités guaiacyl, tandis que les bois durs possèdent une lignine avec une proportion

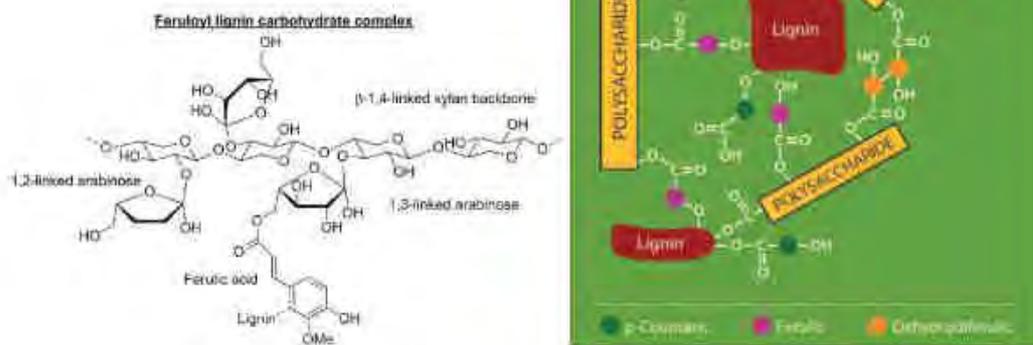
plus élevée en unités syringyl. Les graminées quant à eux possèdent très peu de groupements hydroxyphenyl

**Tableau 1.8** Caractéristiques des lignines dans différents types de biomasse (Barakat et al., 2014)

Biomasses	Miscanthus	Tige de tournesol	Tige de maïs	Paille de riz	Paille de blé
Lignines klason (%)	17.7	20.3	13.9	13.3	20.4
Liaisons $\beta$ -O-4 ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ of lignin)	1465	1820	784	367	1055
G/S/H (%)	48.5/49.7/1.8	46.9/52.9/0.2	38.6/59.8/1.6	62.6/33.3/4.1	49.6/48.8/1.6
S/G	1.02	1.13	1.55	0.53	0.96
AF ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	0.44	0.82	1.2	1.22	0.19

*AF : Acide Ferulique ; S: unités syringyl; G: unités guaiacyl; H: unités hydrocinnamic*

Les lignines forment des liaisons avec les hémicelluloses. Notamment, chez graminées des complexes entre les lignines et les polysaccharides (LCC : Lignine Carbohydrate Complex en anglais) sont formés via des liaisons esters avec des acides féruliques liés aux arabinoxylanes (**Figure 1.24**). Les acides féruliques peuvent aussi induire des dimérisation des chaînes d'hémicelluloses augmentant la rigidité. Les LCC sont aussi retrouvés dans les bois tendres et durs (Brandt et al., 2013). Il reste à rajouter que les lignines forment un polymère hydrophobe qui contribue à la rigidité de la paroi. D'un point de vue biologique, les lignines servent de barrière de protection contre les pathogènes. Ainsi, l'absence d'une structure répétée fait que sa décomposition par des enzymes est difficile (Marriott et al., 2016).



**Figure 1.24** Complexes entre les lignines et les polysaccharides impliquant des liaisons avec l'acide ferulique (à gauche). Le réseau qui en découle (à droite) (Brant et al., 2013)

## 1.4 Hydrolyse enzymatique pour la production de bioéthanol

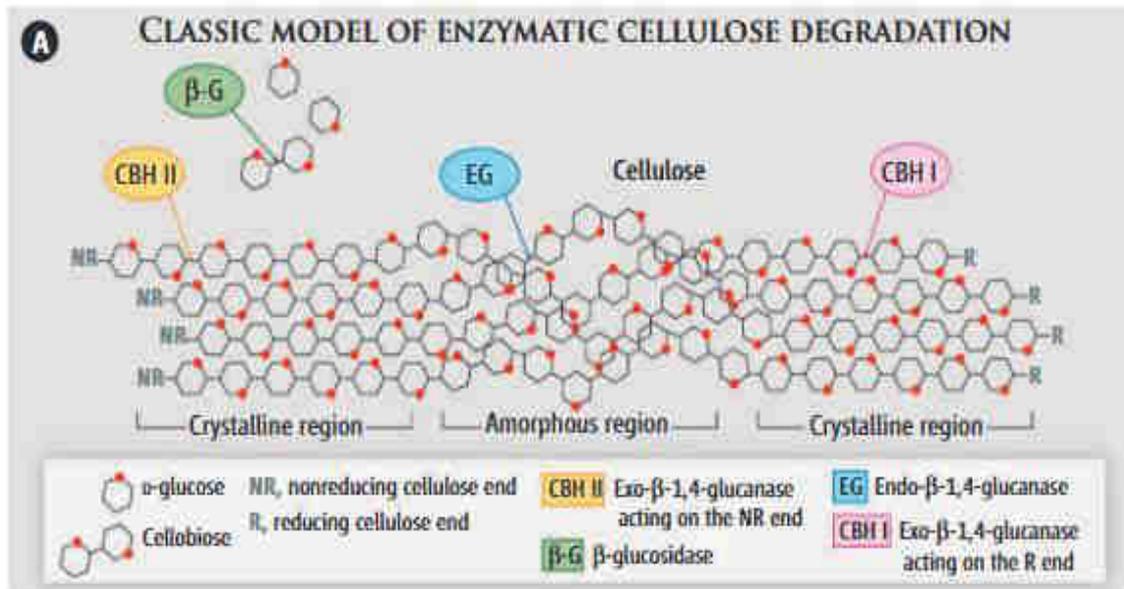
L'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles pour la production de bioéthanol est possible par hydrolyse enzymatique ou par hydrolyse acide. L'utilisation d'enzymes pour l'hydrolyse des polysaccharides permet d'appliquer une catalyse dans des conditions plus douces (généralement 50°C à pH 5.0) qu'une hydrolyse acide (100-250°C pH 1.5-2.2), permettant d'obtenir un procédé plus environnemental et dans lequel il y a moins de risque de formation d'inhibiteurs tels que le HMF (Ferreira et al., 2009; Xiang et al., 2004).

### 1.4.1 Enzymes et mécanismes d'action

L'hydrolyse par voie biochimie des polysaccharides se fait par le biais d'enzymes. Les enzymes lignocellulolytiques sont produites par des microorganismes (champignons et bactéries) et plantes optimum enzymes thermophiles (Juturu and Wu, 2014). Parmi ces microorganismes, *Trichoderma reesei* (champignon filamenteux mésophile) est l'un des plus étudiés pour la sécrétion d'enzymes thermophiles pouvant dégrader la cellulose (Bischof et al., 2016). Les enzymes thermophiles sont d'un grand intérêt puis qu'elles possèdent une activité plus spécifique (moins d'enzymes sont utilisées), une plus grande stabilité et permettent d'avoir un procédé plus flexible (généralement l'optimum d'activité est autour de 50°C)(Kubicek, 1992) .

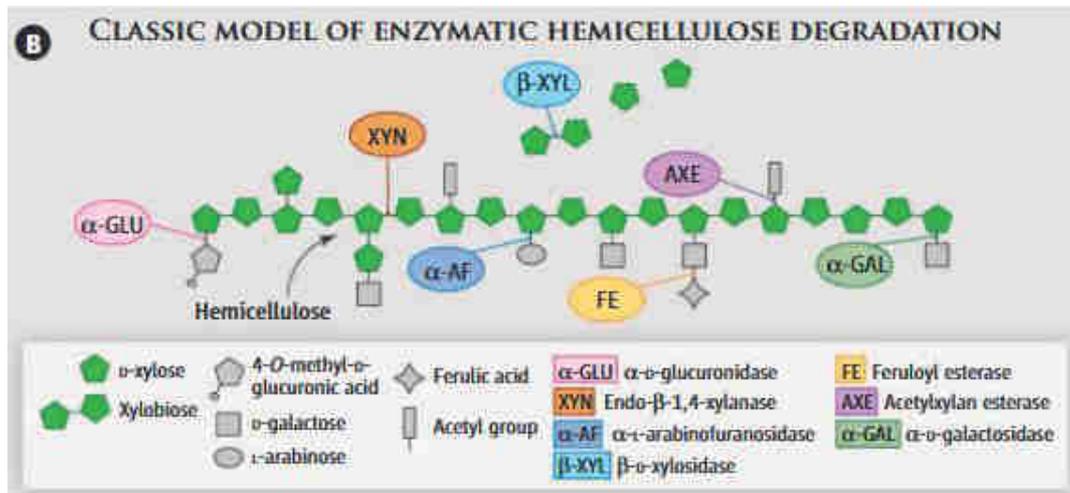
L'hydrolyse enzymatique de la cellulose requiert l'action synergique de 3 cellulases dont une endo- $\beta$ -1,4 glucanase (EG, EC 3.2.1.4), une cellobiohydrolase et une  $\beta$ -1,4-glucanase (EG, EC 3.2.1.21). Les endoglucanases hydrolysent les liaisons glycosidiques au niveau des régions amorphes de la cellulose produisant des longues chaînes d'oligomères. Par la suite, les cellobiohydrolases vont cliver ces

longues chaînes pour former du cellobiose. Il existe 2 types d'exoglucanases en fonction de la direction par laquelle elles vont hydrolyser la chaîne de cellulose, commençant par l'extrémité réductrice (CBH I, E.C. 3.2.1.176) ou par l'extrémité non-réductrice (CBH2.E.C.3.2.1.91). Le cellobiose est hydrolysé en 2 molécules de glucose par la  $\beta$ -glucanase(**Figure 1.25**)(Berlin, 2013; Juturu and Wu, 2014).



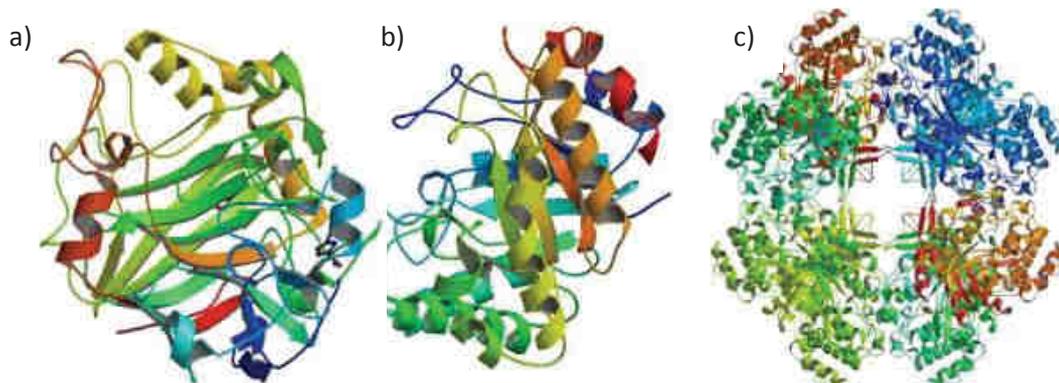
**Figure 1.25** Modèle classique de la dégradation enzymatique de la cellulose (Belin, 2013)

D'autre part l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses fait appel à plusieurs types d'activités (**Figure 1.26**). Les liaisons internes des chaînes de xylane sont hydrolysées par des endo-1,4-D-xylanases (E.C.3.2.1.8), par la suite les chaînes d'oligomères de xylose sont cassées par des 1,4- $\beta$ -D-xylosidases à partir de leur extrémité non-réductrice. Les enzymes catalysant la rupture des chaînes de mannose sont des endo-1,4- $\beta$ -D-mannosidases (EC 3.2.1.78), qui agissent au niveau des liaisons internes et des 1,4- $\beta$ -D-mannosidases (EC 3.2.1.25) qui clivent les mannosides. Les substitutions des chaînes sont retirées par plusieurs types d'enzymes :  $\alpha$ -D-galactosidases (EC 3.2.1.22),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidases (EC3.2.1.139), acétyl xylane estérases (EC 3.2.1.72) et des acides feruloyl et p-cumaric estérases (**Figure 1.26**) (Jørgensen et al., 2007a).



**Figure 1.26** Modèle classique de la dégradation enzymatique des hémicelluloses (Beliner, 2013)

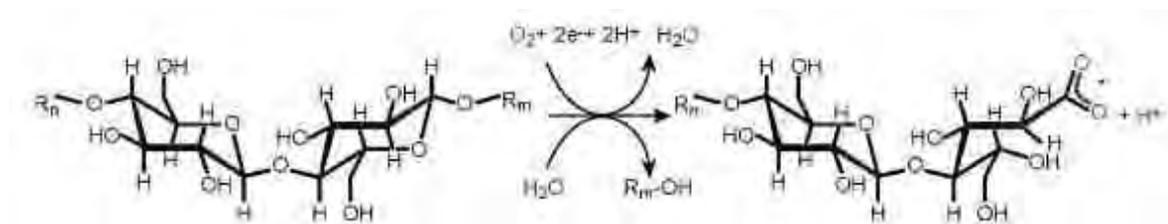
Au niveau structural, les hydrolases sont des protéines modulaires composées d'un site catalytique et un domaine de liaison (CBM : Carbohydrate Binding Module). Les CBM sont regroupés par familles en fonction de leur séquence en acides aminés (<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>). Le CBM permet de rapprocher le site catalytique à son substrat et d'assurer sa bonne orientation (Boraston et al., 2004). Ainsi la présence de CBM est requise pour assurer une hydrolyse efficace des polysaccharides de la paroi (Suurnäkki et al., 2000). Le site catalytique caractéristique des cellulases forme un tunnel ou une crevasse (**Figure 1.27**)(Juturu and Wu, 2014).



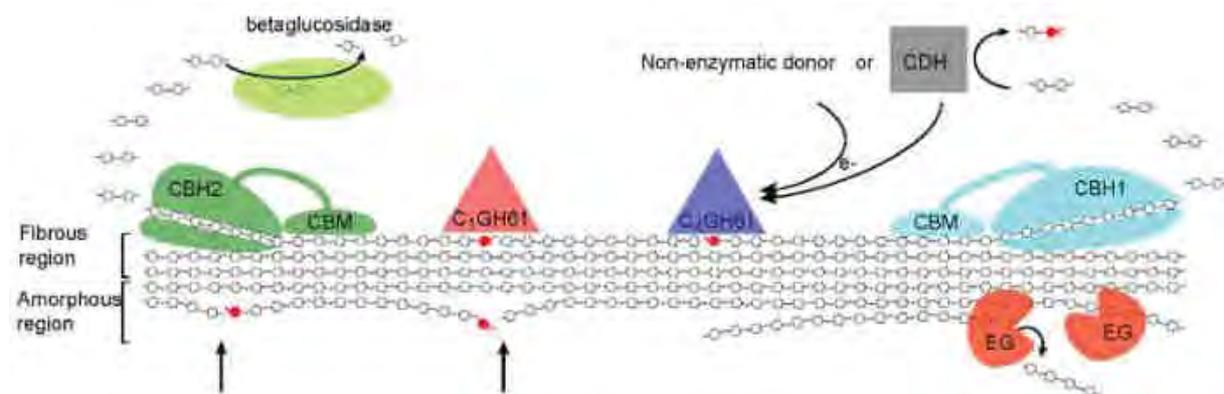
**Figure 1.27** Représentation des structures obtenues par cristallinité des sites catalytiques d'une exoglucanase (a), une endoglucanase et une glycanase (c) (Juturu and Wu, 2014)

Une autre famille d'enzymes de plus en plus étudiée et utilisée pour la saccharification des polysaccharides de la paroi végétale sont les polysaccharides monooxygénases (LPMO : Lytic Polysaccharide MonOxygenase). Ce type d'enzyme possède une structure plate, différente de celle des cellulases (Beeson et al., 2015). Cette structure posséderait une affinité pour les surfaces cristallines de la cellulose, et ainsi provoquerait une rupture de l'entassement cristallin. De ce fait, les LPMO augmenterait l'accessibilité d'un côté par l'incision du substrat et d'autre part en introduisant un

groupement chargé (**Figure 1.27**)(Horn et al., 2012). La réaction des LPMO a besoin d'un donneur de deux électrons, au niveau de la paroi ce donneur peut être l'acide gallique ou la lignine (Beeson et al., 2015). L'oxydation de la cellulose pourrait ainsi créer une synergie entre LPMO et cellobiohydrolases qui attaquent les extrémités non-réductrices. L'introduction des LPMO a créé un nouveau modèle de dégradation de la cellulose (**Figure 1.29**). Les LPMO représentent un potentiel pour l'amélioration de la saccharification enzymatique ; notamment le cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 de Novozymes contient une GH61s (LPMO) qui améliorerait l'efficacité de l'hydrolyse comparé à son prédécesseur.



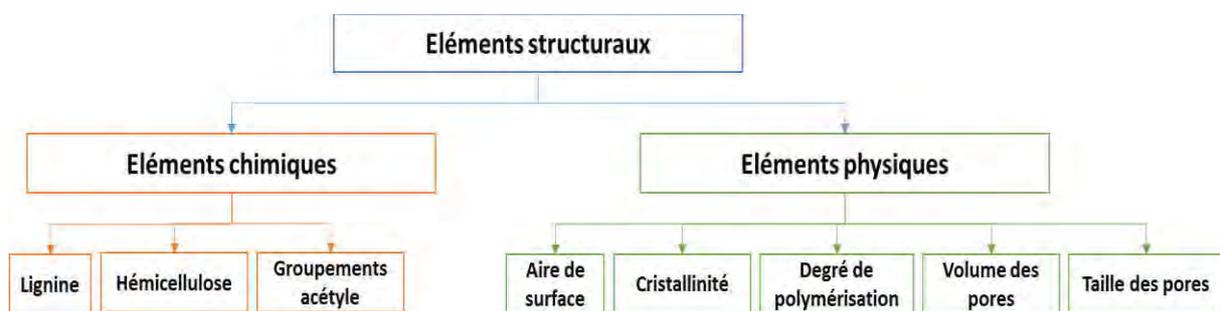
**Figure 1.28** Rupture de la cellulose par les LPMO (Horn et al.,2012)



**Figure 1.29** Model de dégradation de la cellulose. EG : Endoglucanase ; CBH : Cellobiohydrolase ; CDH : Cellobiose-dehydrogenase ; CBM : Carbohydrate binding Module ; GH61 est une LPMO (Horn et al., 2012)

### 1.4.2 Facteurs structuraux influençant l'hydrolyse enzymatique

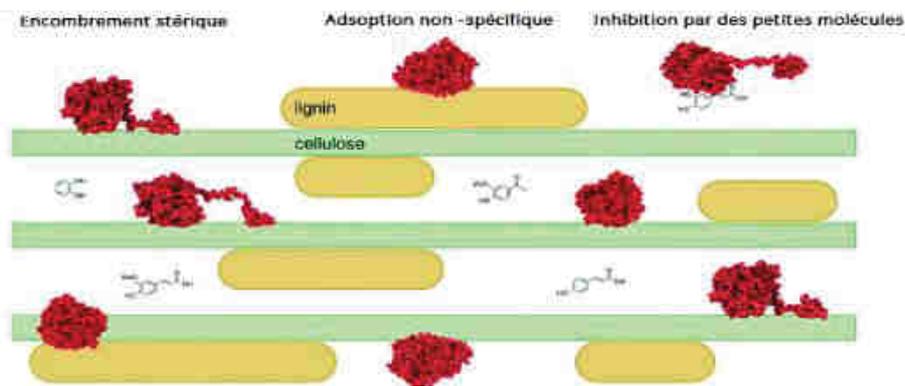
L'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique est affectée par des éléments structuraux de la matière lignocellulosique elle-même. L'hydrolyse enzymatique de la paroi cellulaire végétale implique l'adsorption des cellulases et hémicellulases à la surface des polysaccharides, la synergie entre les différentes enzymes et la libération des produits dans le liquide. Dans la littérature des nombreuses études pointent les paramètres structuraux comme les facteurs principaux de la biomasse lignocellulosique influençant l'hydrolyse enzymatique. Ces éléments sont séparés en paramètres chimiques et paramètres physiques (**Figure 1.30**) (Zhao et al., 2012a; Zhu et al., 2008).



**Figure 1.30** Éléments structuraux contribuant à la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique (Zhu et al., 2008)

#### 1.4.2.1 Composition chimique

Les lignines constituent une barrière physique contre l'attaque de microorganismes et insectes au niveau de la plante, c'est la raison pour laquelle elles sont désignées comme un des principaux facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et des hémicelluloses en inhibant l'action des enzymes par différents mécanismes (Li and Zheng, 2017). Les mécanismes d'inhibition sont l'adsorption des enzymes et l'encombrement stérique (**Figure 1.31**)(Donohoe and Resch, 2015). Les lignines adsorbent plus facilement les enzymes que les polysaccharides, ce type d'interaction est non-spécifique et irréversible. Lorsque les enzymes sont adsorbées sur les lignines, la concentration en enzymes disponible diminue et le taux de conversion des polysaccharides en monomères diminue (Pareek et al., 2013). Cette interaction pose aussi des problèmes en ce qui concerne la récupération des enzymes après saccharification (Rahikainen et al., 2013). Les mécanismes d'adsorption des enzymes sur les lignines sont dus à des interactions hydrophobes, à des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène entre les lignines et les enzymes (Li and Zheng, 2017).



**Figure 1.31** Perturbations causées par la lignine. La lignine (jaune) inhibe l'action des cellulases (rouge) sur la cellulose (vert) par l'encombrement stérique en réduisant l'accès au substrat, par adsorption non-spécifique des cellulases de façon directe ou indirecte (Donohoe and Resch, 2015)

L'adsorption non spécifique et improductive des enzymes sur les lignines serait produite principalement par des interactions de type hydrophobe entre des zones hydrophobes des lignines et des cycles aromatiques des acides aminés de cellulases (Qin et al., 2014). Certaines études, montrent que les interactions de type hydrophobe se font entre le CBM des cellulases et les lignines (Vermaas et al., 2015). D'autre part, les interactions électrostatiques entre les groupes fonctionnels des lignines (carboxyle et hydroxyle) et des acides aminés des enzymes, qui en solution aqueuse peuvent changer de charge à la surface, induisant leur adsorption à la lignine (Fritz et al., 2015). Ce type d'interaction dépend du pH de la réaction, notamment du point isoélectrique des enzymes utilisées puisqu'à certains pH la charge des enzymes est positive, induisant des interactions électrostatiques avec la lignine chargée négativement. Les liaisons hydrogènes, quant à elles, seraient dues aux groupements phénoliques des lignines, mais d'études restent à être réalisées afin de clarifier leur rôle dans les mécanismes d'interaction lignines-enzymes (Li and Zheng, 2017).

D'autre part, les lignines peuvent aussi inhiber l'hydrolyse enzymatique par l'encombrement stérique. Des études avec de la lignine isolée montrent qu'elle se lie à la surface de la cellulose, bloquant la fixation des enzymes à sa surface et retardant leur action (Vermaas et al., 2015). De manière plus importante l'encombrement stérique est souvent observé lors des interactions entre les lignines obtenues lors des prétraitements, de type acide et hydrothermal généralement. A l'issue de ces prétraitements, surtout dans des conditions de haute sévérité, les lignines sont retrouvées sous forme de gouttelettes à la surface des fibres (Donohoe et al., 2008; Kumar et al., 2013; Zhuang et al., 2017). Ce type de lignines peuvent être retrouvées aussi sous forme de pseudo-lignines (composées de

polysaccharides et lignines) qui se déposeraient à la surface de la cellulose et retarderaient l'action des enzymes.

L'interaction entre lignines et enzymes est influencée par: la quantité de lignines, sa composition en unités G, S et H, la structure, ses propriétés à la surface et son poids moléculaire (Li and Zheng, 2017). La modification génétique de la voie de biosynthèse des lignines a permis d'étudier de façon plus spécifique l'influence des propriétés des lignines sur l'hydrolyse enzymatique (Anderson et al., 2015; Bonawitz et al., 2014; Chen and Dixon, 2007). Une diminution du contenu de lignines dans la biomasse soit par modification génétique soit par prétraitement est positivement corrélé au rendement en sucres (Chapple et al., 2007; Chen and Dixon, 2007; Mendes et al., 2011). De même, la composition des lignines a été étudiée, les lignines avec plus d'unités G montrent une affinité plus importante aux enzymes que celle avec des unités S (Guo et al., 2014; Ko et al., 2015). De plus, l'augmentation du ratio S/G contribue à la formation de liaisons de type  $\beta$ -O-4 qui sont plus mobiles et permettent une structure plus susceptible aux pretreatment (Papa et al., 2012).

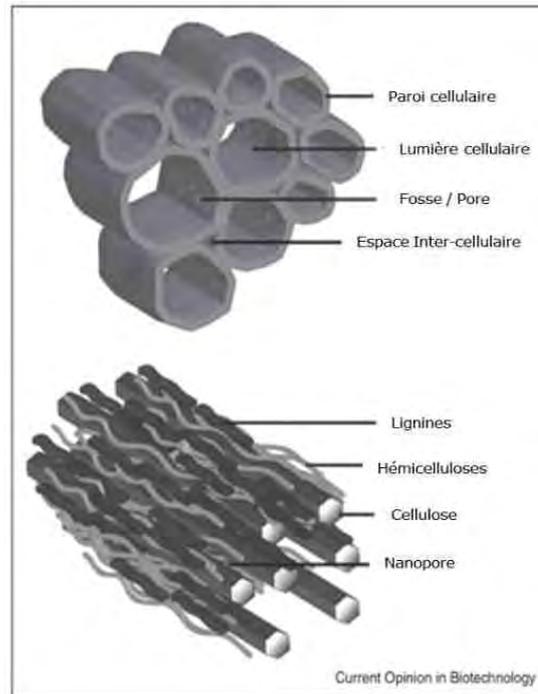
Les hémicelluloses tout comme les lignines forment une barrière physique de protection et un facteur limitant de l'hydrolyse enzymatique. L'effet limitant des hémicelluloses est moindre que celui des lignines, son effet étant principalement de limiter l'accès physique des cellulases. Les prétraitements visant à l'élimination des hémicelluloses tels que les prétraitements à l'acide, à la vapeur ou alcalins permettent d'obtenir des rendements en sucres plus élevés (Öhgren et al., 2007a; Zhao et al., 2008). L'élimination des chaînes de xylane influencent la quantité de d'enzyme utilisée ainsi que les rendements en glucose (Bura et al., 2009). Cependant l'évaluation de l'effet des hémicelluloses sur l'hydrolyse enzymatique reste difficile due au fait que les hémicelluloses sont liées aux lignines. Lors de l'élimination des hémicelluloses, une partie des lignines est souvent éliminée. De plus, comme mentionné auparavant les lignines dans certains cas sont susceptible de changer de structure et avoir des interactions avec les polysaccharides (Bichot et al., 2018; Zhao et al., 2012a).

Un autre des facteurs chimiques influençant l'hydrolyse enzymatique à moindre étendue est la présence de groupements acétyle et les acides hydroxycinnamiques. Le niveau d'acétylation de la biomasse a une influence sur son hydrolyse enzymatique (Jiang et al., 2014). Les groupements acétyle pourraient inhiber la formation de liaisons hydrogènes entre la cellulose et le CBD des cellulases (Ravindran and Jaiswal, 2016). Les acides hydroxycinnamiques présents dans la paroi végétale sont l'acide ferulique et l'acide p-coumarique. L'acide ferulique a un rôle au niveau de la liaison entre les hémicelluloses et la lignine et entre chaînes d'hémicelluloses à travers des liaisons éther et ester. Quant à l'acide p-coumarique, il est estérifié entre la lignine et les hémicelluloses. L'acide ferulique fait partie des facteurs de récalcitrance de la biomasse lignocellulosique (Oliveira et al., 2015). Cependant,

la rupture des liaisons ester comme éther reste difficile puisqu'il s'agit d'une liaison covalente (Bichot et al., 2018).

#### **1.4.2.2 Structure physique**

Au niveau de la structure physique, les paramètres contribuant à la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique à l'attaque enzymatique sont la surface accessible aux enzymes, la cristallinité et le degré de polymérisation des chaînes de polysaccharides (Zhao et al., 2012a). L'hydrolyse enzymatique requiert le contact entre les enzymes à la surface de la cellulose et des hémicelluloses, c'est la raison pour laquelle un des paramètres critiques pour obtenir un rendement et un taux de conversion convenables est la surface accessible (en anglais ASA : Accessible Surface Area) (Arantes and Saddler, 2010; Wang et al., 2012). La surface accessible est divisée en surface intérieure, liée à la porosité et la surface extérieure, déterminée par la taille des particules (Arantes and Saddler, 2011). L'accès des cellulases à la cellulose se fait principalement au niveau des pores, notamment 90% de la digestibilité des substrats est due à la surface accessible par les pores (Wang et al., 2012). Il existe plusieurs échelles de porosité au niveau de la biomasse lignocellulosique (**Figure 1.32**) (Viamajala et al., 2010). Le lumen de la cellule, représente le premier niveau de porosité, ils ne forment pas une barrière pour les enzymes. Les fosses ou pores sont des régions où la paroi cellulaire est absente et constitue un point de liaison entre deux lumens de deux cellules adjacentes, ils mesurent entre 20 et 100nm. A titre d'exemple une Cel7A, une des principales cellobiohydrolases de *Trichoderma reesei* mesure 4 x 5 x 13 nm avec un poids moléculaire de 65 kDa, raison pour laquelle ces fossés ne sont pas une barrière pour les enzymes (Abuja et al., 1988). La taille des pores de la paroi native est aux alentours de 5 et 10nm (Carpita et al., 1979), afin de permettre une pénétration optimale des enzymes la taille des pores devrait être entre 50 et 100nm (Davison et al., 2013).



**Figure 1.32** Représentation des échelles de porosité, du lumen aux pores entre les microfibrilles (Viamajala et al., 2010)

Les techniques de mesure de la porosité de la biomasse lignocellulosique sont nombreuses. Parmi les plus utilisées, le BET (Brunauer-Emmet-Teller) est une méthode rapide et fiable qui se base sur la mesure de l'adsorption de l'azote. Cependant cette méthode mesure la surface accessible à l'azote, molécule plus petite, que celle des enzymes. D'autres méthodes sont: la porosimétrie au mercure, l'utilisation de colorants (Simon's stain), l'exclusion des molécules inertes, l'adsorption par des protéines, la résonance nucléaire (Meng and Ragauskas, 2014). Chacune de ces techniques possède des désavantages souvent reliés à la préparation des échantillons ou au coût de l'analyse.

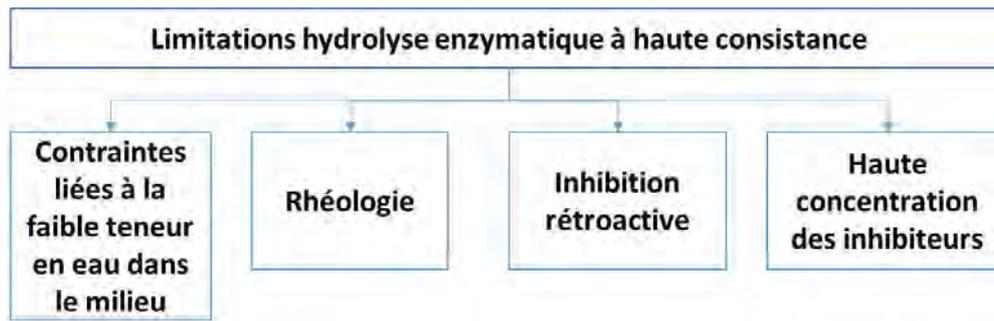
Comme discuté auparavant, la cellulose dans la biomasse lignocellulosique est présente sous forme amorphe et cristalline. La cristallinité de la cellulose représente un facteur limitant de l'hydrolyse enzymatique. Ainsi l'hydrolyse est de 3 à 30 fois plus rapide pour des celluloses de type amorphe que pour la cellulose cristalline. Ceci est notamment lié au fait que cette dernière possède un nombre plus important de liaisons hydrogènes (Zhang and Lynd, 2004). Des études sur de la cellulose isolée ont montré que l'hydrolyse enzymatique des régions amorphes a lieu en premier et celle des régions plus récalcitrante après (Hall et al., 2010). L'étude de la cristallinité de la cellulose dans des substrats de biomasse lignocellulosique est plus complexe, notamment par la présence des hémicelluloses et des lignines qui sont amorphes. Ainsi lorsqu'ils sont retirés des substrats (lors des prétraitements) la cristallinité de l'échantillon a tendance à augmenter (Liu et al., 2018). La technique la plus souvent appliquée pour la mesure de la cristallinité de la cellulose est basée sur la diffraction de rayons X.

Un autre facteur limitant l'hydrolyse enzymatique est le degré de polymérisation de la cellulose. La cellulose est constituée de chaînes de glucose caractérisées par leur DP, lors de l'hydrolyse enzymatique ces chaînes sont dépolymérisées par l'effet synergique des cellulases. Les endo-glucanases vont reconnaître et hydrolyser la cellulose amorphe, réduisant la chaîne à une DP de 30 à 60. Les exo-glucanases vont identifier et se fixer à des substrats avec un DP aux environs de 10 et les  $\beta$ -Glucosidases à ceux avec un DP inférieur à 7 pour produire du cellobiose (Gupta and Lee, 2009). Suivant ce mécanisme, une cellulose avec un DP faible est hydrolysé plus facilement (Zhao et al., 2012a). Cependant, la modification du DP est souvent accompagnée d'une modification d'un autre paramètre, dont la cristallinité ou la porosité raison pour laquelle évaluer son influence isolée est complexe.

### 1.4.3 Hydrolyse enzymatique à haute consistance

L'hydrolyse enzymatique à haute consistance a lieu lorsque celle-ci est opérée à une consistance au-dessus de 15% (m/m) en charge de matières solides. Il s'agit donc d'une réaction dans laquelle il y a très peu d'eau libre. A faible consistance, les sucres sont peu concentrés, l'apport en eau est élevé et les coûts d'investissement sont élevés (Chen and Liu, 2017). L'hydrolyse à haute consistance est un moyen d'obtenir un procédé économiquement viable. Notamment un de ces avantages, comparé à une hydrolyse à faible et à moyenne consistance est d'obtenir concentration en sucres élevée (Roche et al., 2009). De cette manière, il est possible d'obtenir une concentration en éthanol plus élevée. La distillation est économiquement viable lorsque la concentration en éthanol dépasse 4% (m/m); afin d'obtenir ce rendement il est nécessaire une concentration de plus de 8% (m/m) en glucose (dans le cas de fermentation uniquement du glucose); raison pour laquelle il faut travailler à une concentration en matière solide dépassant les 20% (m/m) (Humbird et al., 2010)(Larsen et al., 2008). En outre, travailler à haute teneur en solides permet de réduire la taille des réacteurs ce qui contribue à une réduction des coûts énergétique et d'investissement du procédé (Xing et al., 2016).

L'augmentation de la matière solide dans le milieu implique une diminution de l'eau dans le milieu, l'augmentation de la concentration des inhibiteurs, l'inhibition rétroactive par des sucres produits et la modification des caractéristiques rhéologiques du milieu (**Figure 1.33**) (Chen and Liu, 2017; Modenbach and Nokes, 2013).



**Figure 1.33** Facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique à haute consistance (Chen et al., 2017)

L'eau joue un rôle critique pour l'hydrolyse enzymatique puisque c'est le solvant dans lequel les enzymes et les produits diffusent, mais aussi l'eau est le réactif permettant de rompre les liaisons glycosidiques (Modenbach and Nokes, 2013; Roberts et al., 2011). Lorsque la consistance en matière solide augmente, l'eau libre dans le milieu diminue ou disparaît produisant une diminution de l'efficacité du transfert de masse et une diminution de la production de sucres (Chen and Liu, 2017; Felby et al., 2008; Modenbach and Nokes, 2013). A une consistance de 20% (m/m), la biomasse absorbe totalement l'eau, et le milieu est complètement dépourvu d'eau libre, de telle sorte que la biomasse agit comme un matériel granulaire humide (Hodge et al., 2008). De plus, lorsque peu d'eau est disponible, l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique est réduite par une faible diffusion des enzymes dans le milieu. Avec la production de sucres par l'hydrolyse enzymatique la faible diffusion des enzymes se voit aggravée par la diminution des molécules d'eau disponible (Roberts et al., 2011)..

Lorsque l'hydrolyse enzymatique est opérée à haute consistance, la viscosité initiale du milieu est élevée, ce qui se traduit par des difficultés pour produire une action de mélange efficace et une augmentation de l'énergie consommée par le réacteur. A échelle laboratoire, ces difficultés sont rencontrées à une consistance en matière solide au-dessus de 10% (m/m) (Jørgensen et al., 2007b). Lorsque l'efficacité du mélange est faible, il est possible de retrouver des zones stagnantes ou d'affaissement, réduisant les opportunités de rencontre entre les enzymes et leur substrat (Carvajal et al., 2012). De plus, l'efficacité de la conversion de sucres se voit affectée par l'augmentation de la concentration d'inhibiteurs. D'un part, les produits issus de l'hydrolyse enzymatique ont été identifiées comme des inhibiteurs des cellulases, notamment le cellobiose, le glucose et les xylooligomères (Bezerra and Dias, 2005; Qing et al., 2010). L'inhibition par le glucose et le cellobiose impliquerait des mécanismes d'adsorption qui ne seraient pas liés au site catalytique (Kumar and Wyman, 2008). Des stratégies l'inhibition rétroactive par des sucres sont l'utilisation de xylanases (pour éviter l'accumulation de xylooligomères), la synergie des différentes cellulases (afin d'éviter

l'accumulation de cellobiose) et l'adoption d'une stratégie de Saccharification et Fermentation Simultanées (SSF)(les sucres sont consommés au fur et à mesure)(Chen and Liu, 2017).

D'autre part, l'inhibition des enzymes peut être due à la haute concentration de produits de dégradation qui sont produits lors de l'étape de prétraitement ou en simultanément lors de l'hydrolyse enzymatique. Parmi les produits de dégradation pouvant inhiber les cellulases, il peut y avoir : des acides, des dérivés de furanes et des composés phénoliques (Hodge et al., 2008; Zhao and Chen, 2014). Ces inhibiteurs peuvent aussi jouer un rôle négatif sur les microorganismes, diminuant l'efficacité de l'étape de fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Afin de surmonter ceci, des stratégies de fed-batch ou détoxification peuvent être appliquées (Chen and Liu, 2017). La stratégie fed-batch consiste à ajouter de façon continue ou par addition programmée le substrat prétraité dans le réacteur (Fockink et al., 2016). Des études montrent que travailler en fed-batch facilite la liquéfaction des substrats et maintient un niveau d'eau disponible qui assure une diffusion rapide des enzymes et des produits (Modenbach and Nokes, 2013). De plus, cette stratégie permet un meilleur mélange dans le temps dû au fait que la viscosité initiale est diminuée (Fockink et al., 2016).

L'augmentation en teneur de solides lors de l'hydrolyse enzymatique permet théoriquement d'atteindre des critères économiques, cependant des contraintes lui sont attribuées. Face à ces défis des solutions sont proposées (**Tableau 1.9**). Ces solutions envisageables restent à être évaluées selon les problèmes rencontrés lors de l'hydrolyse et selon le procédé qui est mis en place pour la production de bioéthanol.

**Tableau 1.9** Facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique à haute consistance et stratégies potentielles pour les surmonter avec leur désavantages (Che et al., 2017)

Contrainte	Solutions potentielles	Désavantages
Eau	Alimentation des solides en mode fed-batch	Augmentation du coût du procédé
	Optimisation des conditions de prétraitement	-
	Application de nouvelles méthodes de mélange	Augmentation du coût du réacteur
	Utilisation de biomasse en granulé	Augmentation de l'énergie consommée
Inhibition rétroactive	Augmenter la charge enzymatique	Augmentation du coût lié aux enzymes
	Améliorer le système synergique des enzymes	-
	Combiner EH et fermentation (SSF)	Réduction de l'activité enzymatique
	Alimentation des enzymes en mode fed-batch	Augmentation coût du procédé
Inhibition par haute concentration des produits de dégradation	Lavage de la matière prétraitée	Augmentation l'apport en eau et le coût du traitement des effluents
	Détoxification	Augmentation de l'utilisation de produits chimiques et coût du traitement de déchets et du procès
	Choix du prétraitement	-
	Optimisation du prétraitement	-
	Augmenter charge enzymatique	Augmentation coût lié aux enzymes

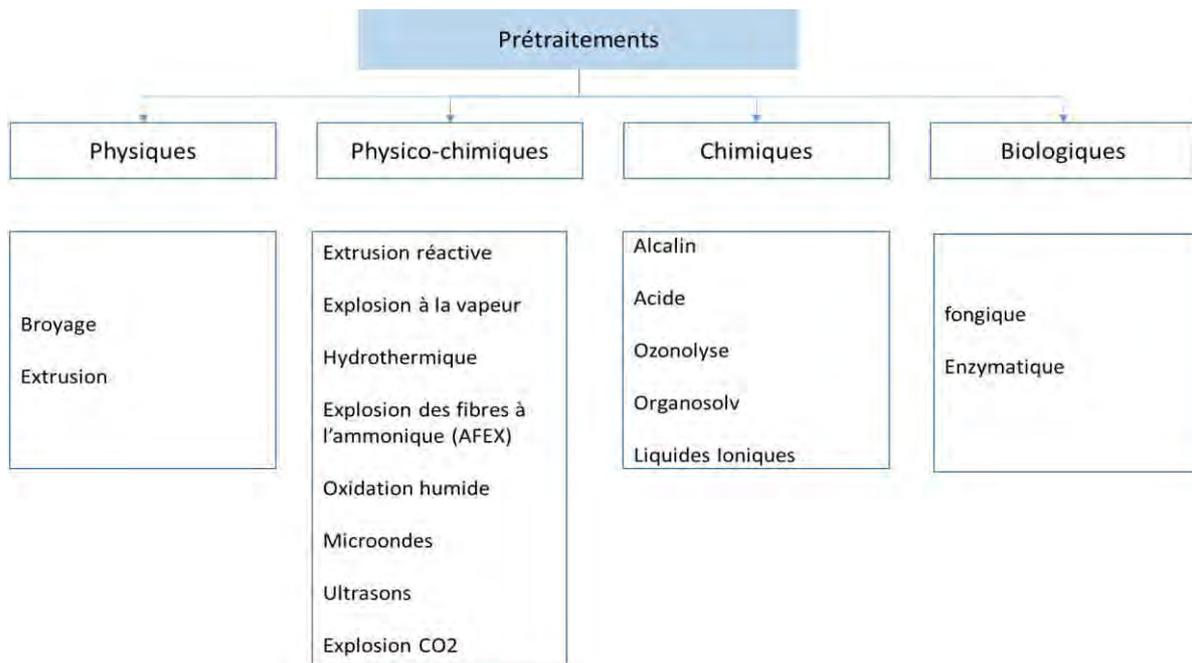
## 1.5 Prétraitements de la biomasse lignocellulosique

### 1.5.1 Vue globale sur les prétraitements

Les prétraitements de la biomasse sont des traitements physiques, chimiques, physico-chimiques et biologiques réalisés avant l'hydrolyse enzymatique qui permettent d'augmenter l'accessibilité des enzymes à leur substrat (**Figure 1.34**). Le but étant de surmonter les contraintes liées à la structure physico-chimique de la biomasse native. Plusieurs critères doivent être remplis afin d'obtenir un prétraitement économiquement viable (Alvira et al., 2010):

- Rendements élevés pour plusieurs types de cultures à emplacements et temps de récolte différents : certains prétraitements sont plus efficaces sur certaines matières que d'autres, c'est ainsi que le prétraitement doit être adaptable à un grand nombre de substrats
- Digestibilité élevée du substrat prétraité : la cellulose obtenue après prétraitement doit être facilement hydrolysable (à plus de 90% en moins de 3 jours à une charge enzymatique de 10 FPU/g cellulose)
- Faible dégradation des polysaccharides : des rendements proches de 100% en sucres fermentescibles provenant de la cellulose et des hémicelluloses doivent être conservés après le prétraitement
- Faible production de produits inhibiteurs : lors du prétraitement, selon les conditions employées, certains composés peuvent être dégradés en produits inhibants l'hydrolyse enzymatique et la fermentation ; parmi ces produits on retrouve des acides carboxyliques, des dérivés furaniques et des composés phénoliques
- Réduction de la taille des particules non-requise : le broyage de la biomasse avant le prétraitement est coûteux et énergivore
- Opérations dans des réacteurs de taille raisonnable et modérée
- Non-production de déchets solides : les coproduits obtenus après prétraitement ne doivent pas être difficiles à traiter
- Efficacité avec des matières à faible contenu humide : l'utilisation de matières avec une matière sèche élevée permettrait de diminuer la consommation d'énergie
- Obtenir une haute concentration en sucres après hydrolyse enzymatique : la concentration en sucres obtenue après prétraitement et hydrolyse enzymatique doit être au-dessus de 10% afin d'assurer une concentration en éthanol adéquate et maintenir les coûts de récupération faibles
- Compatible avec la fermentation
- Récupération des lignines et/ou autres composés pour leur transformation et la valorisation des coproduits.

- Faible exigence en énergie

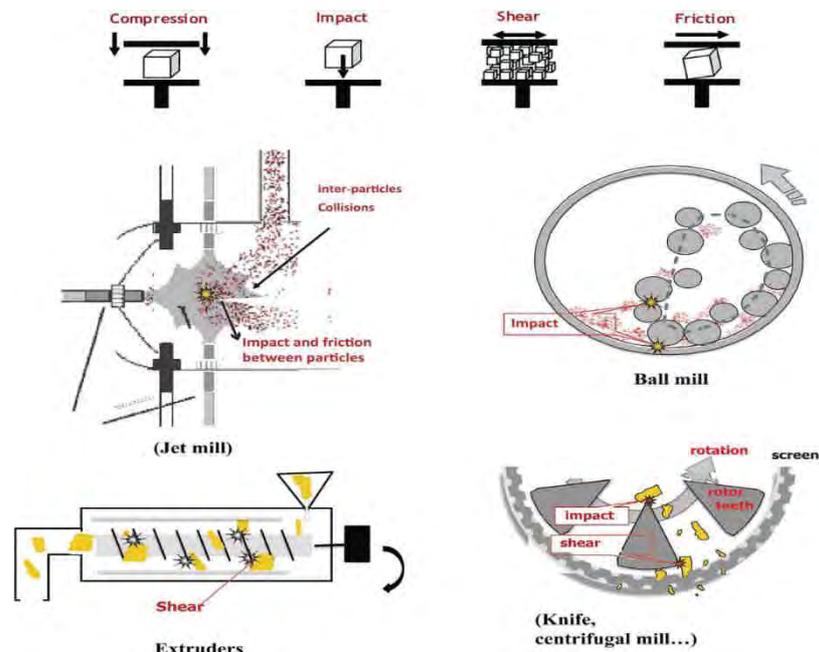


**Figure 1.34** Prétraitements souvent utilisés sur la biomasse lignocellulosique (Alvira et al., 2010)

### 1.5.1.1 Les prétraitements physiques

Les prétraitements physiques agissent de façon à diminuer mécaniquement la taille des particules, sans utilisation de produits chimiques ou de microorganismes. La réduction de la taille est un prérequis pour les procédés chimiques ou biologiques (Zhao et al., 2012b). De même, diminuer la taille de la biomasse permet de densifier la biomasse et faciliter son transport et en stockage. La réduction de la taille des particules se fait par différents types de contraintes : choc, compression, friction et cisaillement (**Figure 1.35**). Les broyeurs à couteaux, marteaux, broches et à centrifugation agissent par choc et cisaillement ; le broyeur à boulets agit par choc et compression entre les billes et les parois, et en extrusion le stress mécanique est relié au cisaillement entre les vis et les parois de l'extrudeur (Barakat et al., 2014). Des études utilisant de la cellulose microcristalline montrent que le broyage permet d'augmenter la surface spécifique et diminuer la cristallinité de la cellulose (Yeh et al., 2010; Yu and Wu, 2011). Par ailleurs, la réduction de la taille de la matière lignocellulosique, du fait de l'augmentation de la surface spécifique et de la rupture de la structure macromoléculaire, induisent une augmentation des rendements en glucose lors de l'hydrolyse enzymatique (Silva et al., 2012). L'effet du broyage sur l'hydrolyse enzymatique est limité. De même, selon le type de broyage, il peut induire des changements au niveau de la structure de la lignine et les hémicelluloses (Ikeda et al., 2002; Silva et al., 2012). L'utilisation de cette méthode reste énergétiquement coûteuse pour cette raison il est nécessaire de la coupler avec un autre type de prétraitement (Barakat et al., 2013). En ce qui

concerne l'extrusion, par rapport aux autres prétraitements, cette technique présente l'avantage de permettre la combinaison de plusieurs types de prétraitement et d'être adapté à grande échelle (Barakat et al., 2014).



**Figure 1.35** Schéma des différents équipements utilisés pour le prétraitement mécanique et les stress mis en place (Barakat et al., 2014)

### 1.5.1.2 Les prétraitements physico-chimiques

Les prétraitements physico-chimiques les plus étudiés sont l'explosion à la vapeur, l'expansion des fibres à l'ammoniaque (AFEX), le prétraitement hydrothermique et l'explosion au CO<sub>2</sub>. Pendant **l'explosion à la vapeur**, la biomasse est dans un premier temps soumise à une haute pression saturée en vapeur, dans un deuxième temps la pression est libérée brutalement. La biomasse subit ainsi une rupture physique et des modifications chimiques (Zhao et al., 2012b). L'action de la vapeur provoque une séparation des fibres et la rupture de la paroi cellulaire (Martin-Sampedro et al., 2011). Le mode d'action de ce prétraitement se rapproche de celui d'un traitement à l'acide, les hémicelluloses sont hydrolysées par l'action des acides organiques produits, tels que l'acide acétique provenant des groupements fonctionnels de la biomasse (Jacquet et al., 2011; Weil et al., 1997). De ce fait, il est plus efficace sur les résidus agronomiques et les bois durs que sur les bois tendres qui contiennent moins d'acide acétique (Prasad et al., 2007). De même, des études montrent l'effet du prétraitement à la

vapeur sur la cristallinité de la cellulose et la redistribution/recondensation et perte des lignines (Auxenfans et al., 2017; Balat, 2011). Cette technologie a déjà été testé pour la production de bioéthanol à partir de plusieurs types de biomasses (Alvira et al., 2010). Ce prétraitement n'utilisant pas de produits chimiques est considéré comme écologique et est déjà en phase de commercialisation (Egüés et al., 2012) (Mussatto and Dragone, 2016). Son désavantage principal est la production d'inhibiteurs par la dégradation des hémicelluloses notamment lorsque la biomasse est imprégnée dans de l'acide avant l'explosion à la vapeur (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

Pendant le **prétraitement des fibres à l'ammoniaque (AFEX)**, en premier lieu la biomasse est imbibée dans de l'ammonium liquide; par la suite la température et la pression sont augmentées, l'ammonium gazeux formé interagit avec la biomasse de façon à diminuer la cristallinité de la cellulose, à pré-hydrolyser les hémicelluloses et à modifier la structure des lignines (Kumar et al., 2009; Laureano-Perez et al., 2005). Ce traitement se montre efficace pour la production de sucres et d'éthanol, sans production d'inhibiteur (Kim and Lee, 2007; Teymouri et al., 2005) L'ammonium pourrait être recyclé, mais du fait de la complexité de ce processus cela pourrait induire des coûts trop élevés (Alvira et al., 2010).

Quant au **prétraitement, l'hydrothermie** consiste à soumettre la biomasse à une pression qui permet de maintenir l'eau liquide à haute température. Pendant ce prétraitement, l'eau auto-ionisée agit comme catalyseur dans la rupture des liaisons éther, et des oligomères et des acides organiques provenant des hémicelluloses sont produits. La libération d'acides organiques, tel que l'acide acétique permet la solubilisation des polysaccharides (Garrote et al., 1999). La solubilisation des hémicelluloses permet une augmentation de la surface spécifique (Mosier et al., 2005). En ce qui concerne les lignines, ce prétraitement ne permet pas sa solubilisation complète. Dans certaines conditions de haute sévérité, les lignines sont retrouvées sous forme de gouttelettes à la surface des fibres ce qui diminue l'accessibilité des enzymes à la cellulose (Ko et al., 2015). Ce prétraitement possède aussi le désavantage de conduire à la production d'inhibiteurs tels que le HMF et le furfural provenant de la dégradation des polysaccharides (Dien et al., 2006). Cette technologie présente toutefois plusieurs avantages : elle n'utilise pas de solvants chimiques, elle permet d'utiliser la biomasse sans passer par une étape de réduction des particules et l'acide acétique produit pourra être recyclé (Lu et al., 2016; Rogalinski et al., 2008).

Lors du prétraitement à **l'explosion au CO<sub>2</sub>**, la biomasse est mise en contact avec du CO<sub>2</sub> supercritique sous pression dans un réacteur adapté ; par la suite elle subit une décompression explosive. Ce prétraitement permet de dissoudre les lignines et de déstructurer les composés afin d'obtenir une surface spécifique plus élevée (Narayanaswamy et al., 2011; Srinivasan and Ju, 2010). Cette

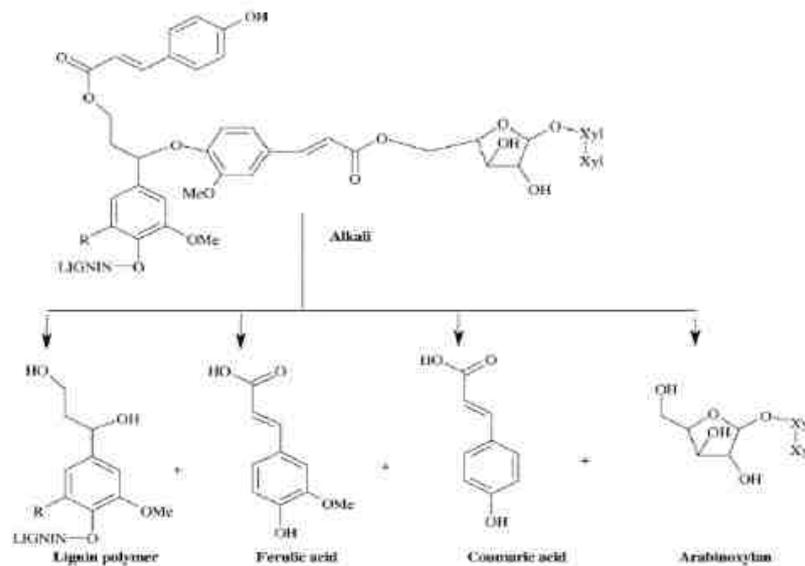
technologie a comme avantage le faible prix du CO<sub>2</sub>, mais possède des forts coûts d'investissement en termes d'infrastructures (Bichot et al., 2018). De plus, les rendements sont faibles selon le type de biomasse (Gu et al., 2013).

### **1.5.1.3 Les prétraitements chimiques**

L'impact des prétraitements chimiques les plus étudiés dépend des réactifs utilisés: acide, alcaline, solvants organiques et liquides ioniques. **Le prétraitement acide**, est un des prétraitements plus classiques, il peut être mis en place avec de l'acide dilué ou concentré. Cependant, l'utilisation d'acide concentré s'avère toxique, dangereux à mettre en place et de plus de par la corrosion produite, il nécessite des équipements spéciaux et coûteux (Talebnia et al., 2010). Le développement de cette technologie avec de l'acide dilué est plus intéressante du fait de l'utilisation des conditions plus douces et son adaptabilité à un grand nombre de biomasses (Hendriks and Zeeman, 2009; Kumar et al., 2009; Mosier et al., 2005). Ce type de prétraitement agit principalement sur la dilution des hémicelluloses, augmentant ainsi l'accessibilité à la cellulose (Alvira et al., 2010). Son efficacité sur la conversion de la cellulose est limitée dans des conditions de température base (<120°C), raison pour laquelle des conditions de température plus élevées sont appliquées (Singh et al., 2015). Cependant à des hautes températures, il y a une augmentation de la formation d'inhibiteurs provenant de la dégradation des hémicelluloses, et les lignines pouvant précipiter à la surface des fibres ce qui engendre une diminution de l'efficacité de la saccharification et de la fermentation (Wang et al., 2011) (Donohoe et al., 2008). En termes de procédé, cette technologie présente des désavantages tels que la nécessité d'inclure une étape de neutralisation ou d'élimination de l'acide est nécessaire pour la fermentation. De plus, de par le prix de l'acide, le développement de ce traitement peut être freiné (Zheng et al., 2009a).

**Le prétraitement alcalin** est une des méthodes les plus utilisées, plusieurs types de technologies ont été étudiées pendant les deux dernières décennies avec des catalyseurs différents : l'hydroxyde de sodium, le sulfite de sodium, l'hydroxyde de potassium, l'hydroxyde calcium, et les hydroxydes d'ammonium (Kim et al., 2016; Singh et al., 2015). Comparée au prétraitement à l'acide ou à l'ammoniaque, cette technologie est appliquée dans des conditions plus douces, ne requiert pas de matériel inoxydables et n'est pas appliquées à haute pression (Mosier et al., 2005). L'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde de calcium sont les catalyseurs les plus étudiés, dans une grande variété de conditions (Galbe and Zacchi, 2007). Le prétraitement alcalin agit sur les complexes Lignines Carbohydrates (LCC), hydrolysant les liaisons éther entre les lignines et l'acides féruliques, et les liaisons ester entre les acides féruliques et les polysaccharides (**Figure 1.36**)(Buranov and Mazza, 2008). De plus, l'agent alcalin produit la dépolymérisation de la lignine par rupture des liaisons inter

moléculaires  $\alpha$  et  $\beta$ -aryl éther de la lignine (Gierer, 2009). Cette technologie permet ainsi d'avoir comme effet principal la délignification de la biomasse. A cet effet, il est ajouté une augmentation de la surface spécifique par gonflement des particules de biomasse et la réduction du degré de polymérisation et de cristallinité de la cellulose (Modenbach, 2013). Dans certaines conditions, les hémicelluloses peuvent aussi être solubilisées (Kim et al., 2016). Son effet est d'autant plus important sur des matières à faible contenu en lignines tels que les graminées que sur les bois tendres (Singh et al., 2015). Un des principaux atouts associé à l'utilisation d'un agent alcalin est la faible dégradation des polysaccharides qui pourrait conduire à la formation d'inhibiteurs de type HMF et furfural (Singh et al., 2015). Un des principaux désavantages de cette technologie est la production de sels pouvant inhiber la fermentation (Bichot et al., 2018).



**Figure 1.36** Complexe lignine-polysaccharide (LCC) de la paroi végétale des résidus de graminée et clivage par un agent alcalin (Buranov and Mazza, 2008)

**Le prétraitement Organosolv** consiste à utiliser des solvants organiques tel que l'éthanol, le méthanol, l'acétone ou l'éthylène glycol (Bichot et al., 2018). Ce prétraitement agit principalement sur les lignines, en engendrant une rupture des liaisons internes (McDonough, 1993). Les effets sur les polysaccharides dépendent de la nature du solvant. Le solvant le plus utilisé est l'éthanol ; des études montrent que l'éthanol a un effet sur la cristallinité de la cellulose et le gonflement des fibres (Hall et al., 2010; Ni and vanHeiningen, 1997). Les désavantages liés à cette technologie sont le besoin d'une étape de lavage de la matière pour éviter la re-précipitation des lignines et le prix des solvants organiques qui reste assez élevé, d'où la nécessité d'ajouter une étape de recyclage (X. Zhao et al., 2009).

L'utilisation de la technologie des **liquides ioniques** pour la production de bioéthanol a pris de l'importance ces dernières années (Olivier-Bourbigou et al., 2010). Les liquides ioniques sont des sels

avec des températures de fusion en dessous de 100°C formés par un cation organique et un anion inorganique ou organique (Bichot et al., 2018). Un des atouts principaux de cette technologie est la dissolution efficace de la cellulose dans des conditions douces (Zheng et al., 2009b). Les liaisons entre les différents composés de la lignocellulose peuvent aussi être attaquées produisant ainsi une séparation de la cellulose, des lignines et des hémicelluloses efficace, sans production d'inhibiteurs (Alvira et al., 2010). Ce type de solvant peut avoir une influence négative sur l'hydrolyse enzymatique et donc la fermentation (H. Zhao et al., 2009). Parmi les limitations pour atteindre la faisabilité commerciale de cette technologie, le prix élevé des liquides ioniques et la toxicité (Brandt-Talbot et al., 2017; Socha et al., 2014).

**Les prétraitements biologiques** font référence à l'utilisation de microorganismes (champignons ou bactéries) ou d'enzymes issus des microorganismes pour augmenter la digestibilité de la biomasse lignocellulosique (Zhao et al., 2012b). L'avantage majeur de ce prétraitement est la mise en place de conditions douces ce qui implique une faible consommation d'énergie et une faible production d'inhibiteurs (Isroi et al., 2011). Les champignons produisent des enzymes qui permettent la dégradation de la paroi, ainsi par exemple la moisissure blanche dégrade la lignine et les hémicelluloses, ce qui produit une augmentation de la surface spécifique et de la taille des pores dans les substrats (Lee et al., 2007). L'action de ces microorganismes est très lente. Elle s'avère parfois peu spécifique, conduisant à la dégradation de la cellulose (Cardona and Sánchez, 2007; Kuhar et al., 2008).

Le **tableau 1.10** regroupe les avantages et désavantages mentionnés ci-dessus sur les prétraitements. Chaque prétraitement permet de modifier la structure chimique et/ou physique de la biomasse afin d'augmenter l'accessibilité. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'action jointe de l'extrusion et du prétraitement alcalin.

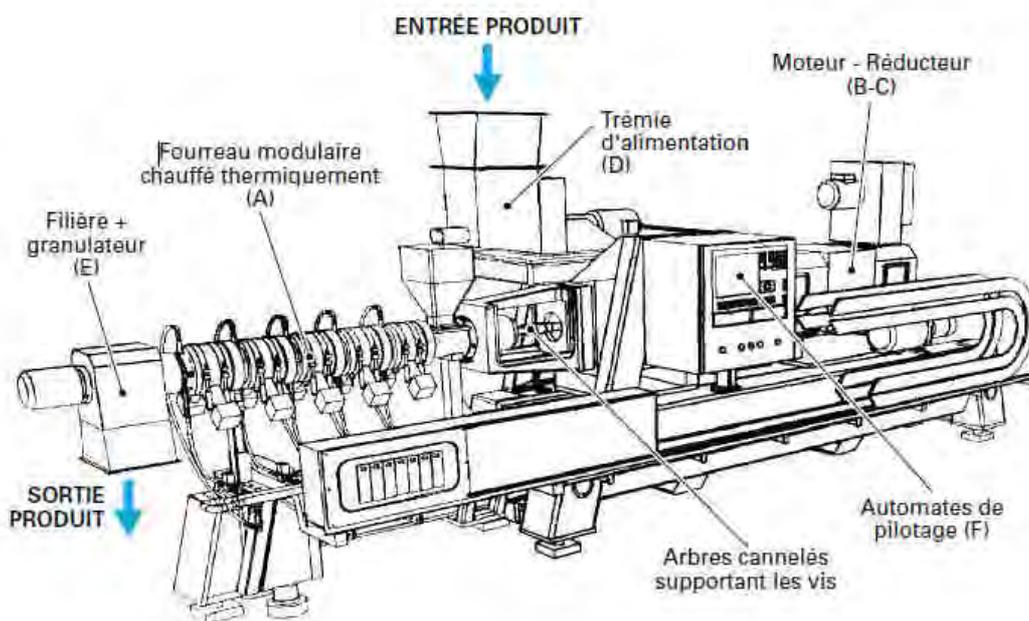
**Tableau 1.10** Avantages et désavantages des prétraitements utilisés pour la production de bioéthanol SSA : Surface Spécifique Accessible

Type de prétraitement	Prétraitement	Avantages	Désavantages
Physique/Mécanique	Broyage	Hausse SSA et diminution cristallinité de la cellulose	Consommation élevée d'énergie Coût élevé Faible rendement
	Extrusion	Hausse SSA et diminution de la cristallinité de la cellulose Procès facilement adaptable, continue et application à grande échelle	
Chimique	Acide dilué	Solubilise les hémicelluloses et liaisons glycosidiques de la cellulose	Formation de produits de dégradation de sucres: HMF et furfural Problèmes de corrosion
	Alcalin	Solubilise les lignines et les hémicelluloses par rupture des liaisons ester et éther Faible production d'inhibiteurs	Présence de sels après prétraitement
	Organosolv	Solubilise des lignines et hémicelluloses Faible production d'inhibiteurs	Couteux Besoin de recycler le solvant
	Liquides Ioniques	Solubilisation des composés lignocellulosique Affaiblissement des liaisons hydrogènes entre les microfibrilles de cellulose Augmente surface spécifique	Besoin d'utiliser de lavage pour EH Coût élevé Haute toxicité Proviennent d'industrie pétrochimique
Physico-chimiques	Hydro thermique	Ne requière pas de réduction de taille Ne requière pas de catalyseur	Consommation élevée d'eau et d'énergie
	Explosion à la vapeur	Transformation et solubilisation des lignines Rendements élevés en glucose et hémicellulose	Production d'inhibiteurs
	Explosion au CO <sub>2</sub>	Solubilisation des lignines Hausse de la surface spécifique par rupture des composés Faible coût du CO <sub>2</sub>	Coût des installations élevé
	AFEX	Rupture des lignines Décristallisation de la cellulose Pas besoin de réduction de taille	Peu d'efficacité pour des biomasses avec importante fraction de lignine Coût important de l'ammoniaque
Biologiques		Plus respectueux de l'environnement car conditions douces Pas de production d'inhibiteurs	Temps de réaction long

### 1.5.2 L'extrusion bi-vis comme prétraitement de la biomasse lignocellulosique

Les procédés d'extrusion mono-vis et bi-vis sont apparus au cours des trente dernières années du 19<sup>ème</sup> siècle. (Bouvier and Campanella, 2014). Aujourd'hui, l'extrusion bi-vis est appliquée de façon industrielle dans des nombreux secteurs tels que le secteur agroalimentaire (Alam et al., 2016) et de la plasturgie (Wagner et al., 2014). L'extrusion bi-vis se base sur l'action d'une double vis à l'intérieur d'un fourreau, dont la température est contrôlée, ainsi des frottements entre la matière, les vis et la paroi du fourreau ont lieu (**Figure 1.37**). Les vis sont des pièces courtes qui vont être placées sur un axe appelé arbre de vis, d'après leur forme l'action exercée sera différente. Ainsi, il sera distingué les vis de convoyage, de cisaillement et de mélange. Les vis sont caractérisées par leur longueur, leur pas, leur nombre de filets et leur sens d'hélice (**Figure 1.18**). Elles peuvent être conjuguées ou trapézoïdales selon la forme des flancs des filets. Les vis peuvent être à un ou plusieurs filets (**Figure 1.39**). Les vis vont aussi se caractériser par leur pas de vis qui peut être positif, négatif (contrefilets), ou neutres.

Dans le cadre de cette thèse, quatre extrudeur de type bi-vis corrotatives ont été employés : Clextral BC21, Clextral BC45, Clextral EV25 et Clextral EV53. Le type des vis utilisées dans les profils sont regroupées dans le **Tableau 1.11**.



**Figure 1.37** Schéma d'une extrudeuse, Clextral

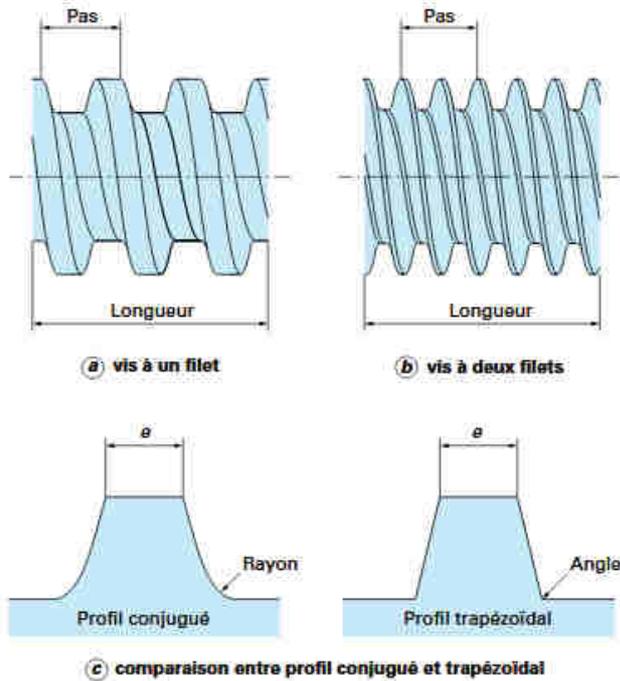


Figure 1.38 Schéma des caractéristiques des vis (Cletral, France)

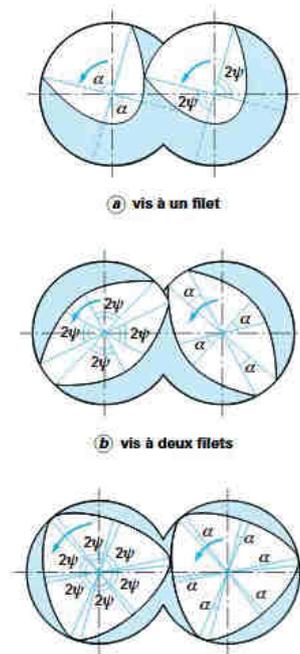


Figure 1.39 Schéma représentant les sections de vis conjuguées (Cletral)

Tableau 1.11 Types de vis utilisées en extrusion bi-vis dans cette étude

Type de pas	Dénomination	Abréviation	Action principale
Direct	Trapézoïdale double filets	T2F	Convoyage
	Conjugué double filets	C2F	Convoyage
Éléments malaxeur (pas direct, inverse ou neutre)	Disque malaxeur monolobe	MAL0	Mélange/Cisaillement
	Disque malaxeur bilobes	BB/MAL2	Mélange
Indirect	Contrefilet à double filets	CF2C	Mélange et cisaillement

L'extrusion bi-vis est une technologie qui présente des nombreux avantages pour le bioraffinage de la biomasse. Cette technologie est développée depuis plus de 30 ans au laboratoire de Chimie Agroindustrielle (Evon et al., 2018). Elle permet entre autre le fractionnement de la biomasse, dans des conditions de faible sévérité, avec une faible concentration de produits chimiques et une faible production d'inhibiteurs. La biomasse peut ainsi être soumise à des actions de mélange, de cisaillement de compression et thermiques permettant des modifications chimiques et physiques de la matière. Le procédé se caractérise ainsi par une importante force de cisaillement et de mélange, un transfert thermique rapide, la possibilité de moduler les conditions dans différentes zones et de travailler à haute consistance. Le procédé d'extrusion bi-vis peut être mis en place avec ou sans catalyseur, dans le premier cas est qualifié d'extrusion réactive. Du fait de ces propriétés, des nombreux brevets ont été déposés mettant en place cette technologie (Duque et al., 2017). Le projet BABETHANOL a mené notamment à la soumission du brevet WO2013182827A8 (Vilarem et al., 2013).

L'extrusion bi-vis pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique a été étudiée dans de nombreuses configurations pour différents types de matière. Quelques exemples sont regroupés dans le **Tableau 1.12**. Les matières premières les plus employées sont des résidus agricoles et de nombreuses études ont été menées sur des résidus de maïs et de graminées, qui sont plus facilement extrudables du fait de leur structure et composition par rapport aux matières forestières. Malgré la difficulté d'extruder les matières issus du bois, des études ont été menées sur du peuplier, de l'eucalyptus et du Douglas.

**Tableau 1.12** Prétraitement de matières lignocellulosiques en extrudeur bi-vis et effets observés

Type d'extrusion	Références	Matières premières	Conditions d'extrusion	Paramètres étudiés	Réponse étudiées	Effets observés
Extrusion Mono-vis	(Karunanithy and Muthukumarappan, 2010)	Switchgrass et Spartina	L/S ratio modifié par ajout d'eau	Vis avec des ratios de compression de 2 :1 et 3 :1, la température de fourreau 50,100 et 150°C et le contenu d'humidité de la matière 15, 25, 35 et 45% ou L/S : 6.7,4. 29. Et 2.6	Taux de sucres récupérés après EH	Effet positif sur la récupération des sucres (glucose et xylose) du taux de compression, effet négatif de la température et du taux d'humidité
Extrusion bi-vis	(Yoo et al., 2012)	Gousse de soja	280-420rpm, 80-140°C, additif PEG	Vitesse de rotation de la vis, température de fourreau, débit alimentation, présence additif PEG et mélange avec amidon	Efficacité HE, Rendement en éthanol, formation d'inhibiteurs	Amélioration de l'hydrolyse enzymatique avec extrusion, faible concentration en inhibiteurs retrouvée, rendement éthanoloïque élevé
	(Zhang et al., 2012)	Résidus de maïs	40-140rpm, 50-140°C	Etude vitesse de vis	HE, cristallinité, surface spécifique	Augmentation de la surface spécifique ayant un impact positif sur EH

	(Zheng et al., 2015)	Epis de maïs	1,67Hz, 75°C	Effet du type de vis prédominant dans profil	Composition extrudats, HE, taille des particules, MEB	Diminution de la taille des particules par extrusion ; formation de pores avec des éléments de convoyage et de mélange ; Augmentation EH
Extrusion réactive	(Vandenbossche et al., 2014b)	Paille de blé	Deux types d'extrudeur, 125,200 et 350 rpm selon extrudeur, filtration	Comparaison prétraitements en extrusion : hydrothermal, acide, alcalin, alcalin-oxydant et alcalin organique modification de la température de réaction	Composition, granulométrie et taux de conversion par HE extrudats obtenus, analyse des inhibiteurs de la fermentation sur la fraction liquide récupérée lors de la filtration	Diminution de la taille des particules, des modifications de la composition de la biomasse par les différents traitements et le rendement en sucres est supérieur avec un traitement alcalin (80% de rendement)
Extrusion bi-vis réactive à la soude	(Duque et al., 2018)	Eucalyptus grandis chips	NaOH/MP >8%, température >100°C	Vitesse de rotation de la vis, température, ratio L/S de la zone de réaction et effet de la	Composition de l'extrudat et hydrolyse enzymatique	Lavage nécessaire pour EH, meilleurs résultats obtenus avec un profil sans filtration

				filtration pendant l'extrusion		
	(Khatri et al., 2018)	Résidus d'alfalfa, résidus de maïs, tiges de quenouille et anas de lin	NaOH/MP 5% (m/m), 200rpm, 180°C	Comparaison entre prétraitements hydrothermal, alcalin et extrusion alcaline	Cristallinité, type de composés à la surface, hydrolyse enzymatique	Alcalins diminuent la quantité d'hémicelluloses à la surface, plus de cellulose à la surface avec extrusion, diminution de la cristallinité à la surface Amélioration de la conversion reliée à la quantité de cellulose en surface
	(Liu et al., 2018)	Résidus de maïs	NaOH/MP 6% (m/m) à 99°C + 1h en batch à 99°C	Comparaison entre prétraitement alcalin et extrusion alcaline,	Cristallinité, composition des extrudats, MEB et rendements HE	Diminution de la cristallinité, meilleure efficacité de l'hydrolyse enzymatique avec extrusion
	(Duque et al., 2013)	Paille d'orge	8% (m/m) NaOH/MP, 150rpm, 68°C	Optimisation du procédé d'extrusion alcaline	Composition de l'extrudat et hydrolyse enzymatique	Enrichissement de la matière en cellulose, solubilisation lignine et hémicelluloses
Extrusion bi-vis réactive avec liquide ionique	(Silva et al., 2012)	Bagasse de canne à sucre	15rpm, 140°C, 25-45(m/m) liquide ionique	Charge en MP, températures de l'extrudeur, nombre de passages dans l'extrudeur	Surface spécifique, cristallinité, HE	Augmentation de l'efficacité de l'HE, diminution de la cristallinité et augmentation de la surface spécifique lors de l'utilisation de l'extrudeur

Extrusion bi-vis après traitement hydrothermal	(Lee et al., 2010a)	Douglas et Eucalyptus	Thermo hydrolyse suivi d'extrusion, 45-120 rpm, température ambiante	Nombre de passages dans l'extrudeur	HE, MEB	Augmentation de l'efficacité HE avec extrusion, pas d'effet du nombre de passages, fibrillation par extrusion
Extrusion bi-vis réactive à l'acide	(Kim et al., 2013)	sciure de peuplier	60rpm, 160-185°C, acide 0,5-7,0% (m/m)	ratio L/S de la réaction, concentration du catalyseur, température du fourreau, conditions de fed batch et SSF	analyse de composition des extrudats, HE, SSF	Augmentation efficacité HE, et libération xyloses, fed-batch en 3 étapes
	(Choi and Oh, 2012)	Paille de colza	19.7rpm, 150°C-170°C	Ratio L/S, concentration acide, température fourreau, conditions opératoires	Composition des extrudats, HE	Augmentation HE par extrusion, procédé en continue améliore le fractionnement hémicelluloses

Extrusion bi-vis réactive à la soude et bioextrusion	(Vandenbossche et al., 2016)	Résidu de maïs doux, bagasse d'agave bleue, résidu de palme, paille d'orge	200rpm, 50°C	Cocktails enzymatiques, comportement des matières	Compositions des extrudats et HE des bioextrudats	Augmentation de l'efficacité de l'EH
	(Vandenbossche et al., 2015)	Résidus de maïs doux	alcalin: 110rpm, 100°C, 10,5% (m/m) NaOH; Bioextrusion: 200rpm, 50°C 4,6% (m/m) enzyme	Effet de la bioextrusion et effet du nombre de passages en extrudeur après bioextrusion	DP, temps de rétention, composition des extrudats, viscosité dynamique, HE, taille des particules, MEB	Action des enzymes confirmée, diminution du DP des oligosaccharides obtenus dans bioextrudat

	(Vandenbossche et al., 2014a)	Résidu de maïs doux, bagasse d'agave bleue, résidu de palme, paille d'orge	85-200 rpm, 68-100°C, 7,5-12,6% (m/m) NaOH/MP, 2,5-11% (mg/g) protéine enz/MP	Effet des prétraitements alcalin sur différentes matières et effet de la bioextrusion	HE, compositions des extrudats, cristallinité	Amélioration efficacité HE, solubilisation des hémicelluloses et diminution de la cristallinité
	(Duque et al., 2014)	Paille d'orge	8% (m/m) NaOH/MP, 150 rpm	Effets de la bioextrusion comparé à l'extrusion alcaline et ajout des enzymes séparé	Efficacité HE, taille des particules	Augmentation efficacité HE par bioextrusion, réduction des tailles de particules
Abréviations : MP : Matière première ; Ratio L/S : ratio Liquide/Solide ; HE : Hydrolyse enzymatique ; DP : Degré de polymérisation ; MEB : Microscopie Electronique à Balayage ; SSF : Saccharification Fermentation Simultanée						

Les études portant sur l'utilisation de l'extrusion bi-vis comme prétraitements de la biomasse lignocellulosique montrent que plusieurs paramètres sont à prendre en compte lors de sa mise en place. Les paramètres les plus importants sont : le profil de vis, la rotation des vis, la température de fourreau, et dans le cas de l'extrusion réactive le ratio liquide/Solide des réactions ainsi que la concentration en réactif par rapport à la matière. Les effets de chacun de ces paramètres est parfois difficile à évaluer de façon séparée car il existe souvent des interactions entre eux. De même, comme le montre le **Tableau 1.12**, les conditions peuvent être très différentes entre les études, et leur comparaison est difficile.

Le profil de vis est un des éléments les plus importants ; il définit les actions mécaniques que l'on souhaite faire subir à la matière. Il aura un effet sur le temps de résidence et le type de forces appliquées sur la biomasse. Zheng et al.(2015) ont étudié l'influence de différents types de vis sur la digestibilité du résidu de maïs, sans utilisation de catalyseur. Les résultats montrent qu'un profil de vis formé principalement de vis de convoyage ou de mélange provoque une augmentation de la taille de pores à la surface des fibres. L'utilisation d'un profil avec des éléments à pas inverse (de type contrefilets) peut toutefois provoquer une redistribution des lignines à la surface des fibres, bloquant certains pores. Ce phénomène est probablement dû à l'augmentation de la température induite par les contrefilets. Ainsi sur le plan des contraintes mécaniques, l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique sera favorisée par des vis de convoyage mais il pourrait être limité par une redistribution des lignines (Zheng et al., 2015). Le profil de vis aussi a une influence en extrusion réactive, notamment en ce qui concerne le mélange des réactifs avec la biomasse. Un profil adapté pourra notamment permettre une amélioration des effets des réactifs par augmentation du temps de séjour (Choi and Oh, 2012).

Dans les études présentées, les températures d'extrusion varient généralement entre 40°C et 200°C pour les températures de fourreau. La température interne de la matière n'est pas indiquée. Les études d'optimisation des prétraitements qui s'intéressent au paramètre « température », montrent un effet positif de l'augmentation de ce facteur sur l'hydrolyse enzymatique. Cet effet reste dans certains cas limité du fait de la recondensation des lignines ou de la dégradation de la cellulose (Duque et al., 2013; Silva et al., 2012). La température de fourreau induit une diminution de la viscosité des mélanges à l'intérieur de l'extrudeur, ce qui a une influence sur le flux, et provoque la diminution du temps de résidence (Choi et al., 2014). Lorsque l'extrusion est réalisée sans catalyseur les températures utilisées doivent être plus élevées (Zhang et al., 2012).

Le ratio L/S est calculé en fonction de la quantité de liquide ajouté dans l'extrudeur à la matière sèche. Ce ratio doit être adapté au profil de vis. Lorsque le ratio L/S est trop élevé des retours du liquide vers

l'alimentation en solide peuvent se produire, tandis que s'il est trop faible l'extrudeur peut être bloqué mécaniquement (Evon et al., 2018). Karunanithy et Muthukumarappan, 2010, ont réalisé l'étude de ce paramètre en extrusion mono-vis. Les résultats montrent que le ratio L/S a une influence significative sur chacun des sucres récupérés après hydrolyse enzymatique, par une modification des forces mécaniques exercées sur la biomasse (Karunanithy and Muthukumarappan, 2010). Dans le cas de l'extrusion réactive, la viscosité de la biomasse est modifiée par la solubilisation de composés et l'influence du L/S est difficilement différentiable de celle du catalyseur ou du réactif (Choi et al., 2014; Duque et al., 2014; Silva et al., 2012). Dans le cas, de l'extrusion avec un module filtrant, le ratio L/S appliqué avant la filtration est important pour assurer la stabilité du bouchon dynamique (Vandenbossche et al., 2014a).

L'extrusion en tant que prétraitement mécanique provoque une déstructuration physique, engendrant une diminution de la taille des particules, une augmentation de la surface spécifique accessible et de la défibrillation (Lee et al., 2010b; Zhang et al., 2012). Cependant, l'effet thermomécanique seul reste insuffisant pour obtenir des taux de conversion en sucres fermentescibles (inférieur à 60%) (Vandenbossche et al., 2014b). Dans le cas de l'extrusion réactive, Duque et al., 2014 ont observé une modification de la taille des particules en sortie de l'extrudeur, en extrusion alcaline et bioextrusion, montrant l'effet de cet agent chimique et des enzymes dans l'extrudeur (Duque et al., 2014).

Dans le cas spécifique de l'extrusion réactive à la soude, les effets de l'extrusion par rapport au prétraitement alcalin en batch sont nombreux. Des différences structurales ont été observées à la surface : une diminution de la cristallinité de la cellulose, la réduction de la présence des hémicelluloses et une augmentation du taux de la cellulose (Khatri et al., 2018). Liu et al., 2018 ont reporté une délignification plus poussée atteignant 69.51% avec le procédé d'extrusion ATSE (Alkaline Twin Screw Extrusion) comparée à 28.79% avec un procédé en batch AP (Alkaline Pretreatment). Ainsi l'ATSE a permis d'atteindre un rendement en sucres de 78.75% comparé à 54% avec l'AP.

Bien que connu dans l'industrie alimentaire, l'emploi d'enzymes en extrusion réactive dans le domaine du prétraitement de la biomasse reste assez nouveau (Gatt et al., 2018). Vandenbossche et al., 2014a, 2015, 2016 ont développé un procédé utilisant des enzymes en extrusion bi-vis, en continu et en une seule étape (Vandenbossche et al., 2016, 2015, 2014a). Le procédé mis en place lors du projet BABETHANOL permet un prétraitement alcalin de la biomasse dans l'extrudeur, suivi d'une étape de neutralisation à l'acide, une étape de filtration et d'une étape d'imprégnation des enzymes lignocellulosiques, le tout à l'intérieur d'un seul extrudeur bi-vis. Le substrat obtenu est directement hydrolysable sans un nouvel apport d'enzymes en réacteur batch. Le prétraitement à la soude en

extrusion permet comme discuté ci-dessus de préparer la biomasse en modifiant sa structure. L'ajout d'acide a pour but de diminuer le pH de la matière afin d'être adapté au pH optimal des enzymes. Le débit d'introduction d'acide permet également d'ajuster le ratio L/S pour le lavage de la matière. Il permet aussi d'augmenter la viscosité du milieu pour assurer la formation du bouchon dynamique qui conduit à la filtration. Le module de filtration permet, en effet, la sortie des sels et des produits de dégradation issus du prétraitement alcalin pouvant inhiber la saccharification et la fermentation. La filtration est produite par l'action combinée des vis de convoyage et des vis de type contrefilet, qui permettent la formation d'un bouchon dynamique. Ce dernier est constitué par la matière qui avance par le convoyage et celle qui remonte du fait de la contre pression exercé par le contre-filet. L'étape de bioextrusion permet d'engager une déconstruction dans l'extrudeur, ainsi qu'une meilleure pénétration des enzymes dans le substrat et d'obtenir des meilleurs rendements d'hydrolyse enzymatique (Duque et al., 2014). Plusieurs coproduits provenant de l'industrie ont été étudiés pour la mise en place de ce procédé : coproduit de maïs doux, bagasse d'agave bleue, le pinzote, la paille d'orge, coproduits de bois d'eucalyptus, sarments de vigne et la bagasse de canne à sucre (Brault, 2013; Vandenbossche et al., 2016). Dans la présente thèse, les études se sont focalisées sur le modèle du coproduit de maïs doux (CMD), formé par les spathes et les rafles après égrenage pour la conserverie des grains.

## 1.6 La fermentation

### 1.6.1 Fermentation et microorganismes

La fermentation alcoolique est un processus biologique dans lequel les sucres monomériques, glucose et xylose sont transformés en éthanol et en CO<sub>2</sub>.



Ce processus de production est retrouvé chez des microorganismes, des levures et des bactéries (Mohd Azhar et al., 2017; Zaldivar et al., 2001). Afin de parvenir à la production d'éthanol à partir de biomasses lignocellulosiques à échelle industrielle, le choix du microorganisme pour la fermentation est soumis à des nombreux critères. D'après Zaldivar et al., (2011) des caractéristiques essentielles et souhaitables sont distinguées (**Tableau 1.13**) (Zaldivar et al., 2001). Ainsi comme caractéristiques essentielles, le microorganisme doit être en mesure de fermenter des hexoses et des pentoses, notamment de pouvoir réaliser une co-fermentation du glucose et du xylose. De cette manière, il serait possible d'obtenir un rendement en éthanol élevé, de plus de 90% du rendement en éthanol théorique avec une faible production de coproduits de type glycérol et succinate. Le microorganisme doit

pourvoir poursuivre la fermentation à une concentration supérieure à 40g/L d'éthanol et si possible en présence d'inhibiteurs provenant de l'étape de prétraitement. Lors de la fermentation, le microorganisme doit être adapté à de légères variations de pH, de température ou de concentration en sels, sucres ou éthanol.

**Tableau 1.13** Caractéristiques essentielles et souhaitables pour le choix sur le microorganisme de la fermentation (Zaldivar et al., 2001)

Caractéristiques essentielles	Caractéristiques souhaitables
Large gamme de substrats utilisables	Utilisation simultanée des sucres
Rendements élevés en éthanol	Hydrolyse de la cellulose et hémicelluloses
Faible production de coproduits	Statut GRAS
Tolérance élevée à l'éthanol	Recyclable
Tolérance augmentée aux inhibiteurs	Exigences nutritionnelles faibles
Adaptabilité à la robustesse du procédé	Tolérance à des pH faibles et hautes températures

GRAS : en anglais « Generally recognize as safe »

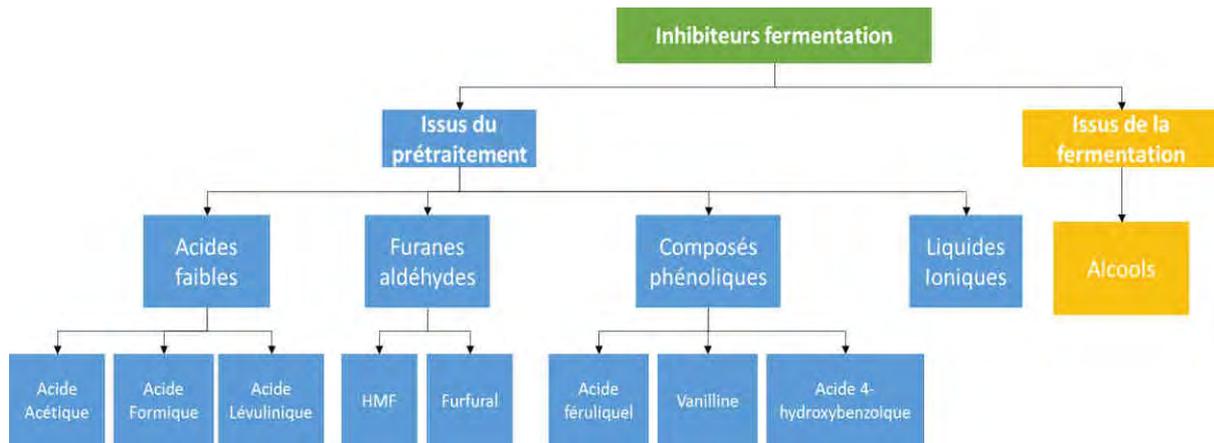
Le microorganisme le plus utilisé pour la fermentation est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Son utilisation pour la fermentation alcoolique remonte à des centaines d'années, pour la production de vin et de bière. Pour la production de bioéthanol lignocellulosique, *S. cerevisiae* possède un rendement en éthanol élevé, une tolérance à éthanol importante et montre des capacités à maintenir le coût de la distillation faible (Kasavi et al., 2012). Cependant, cette levure est incapable naturellement de réaliser la fermentation à partir de pentoses, raison pour laquelle des modifications génétiques de cette souche ont été menées. Des souches recombinantes de *S.cerevisiae* pouvant réaliser la co-fermentation des hexoses et des pentoses ont été obtenues en introduisant des voies métaboliques provenant de levures telles que *P. tannophilus*, *C. shehatae* et *P. stipitis* (Kumari and Pramanik, 2013) ou des bactéries *E. coli*, *Bacillus subtilis* et *Thermos thermo-philus* (Zaldivar et al., 2001). Une autre solution permettant de surmonter ceci est la co-culture, c'est-à-dire la culture et la fermentation simultanée par deux microorganismes, un fermentant les hexoses et un autre les pentoses (Singh et al., 2014).

Lors de la fermentation avec des levures, il est nécessaire de prendre en compte plusieurs paramètres, dont la température, le pH, la présence d'inhibiteurs, la concentration en sucres, le temps de fermentation et le taux d'agitation (Mohd Azhar et al., 2017). La température est un facteur critique

pour la croissance et la fermentation. La plupart des souches de *S.cerevisiae* ont une température optimale de fermentation autour de 30°C ; au-dessus de cette température les enzymes du métabolisme peuvent être dénaturées ou inactivées (Phisalaphong et al., 2006). Il existe cependant des levures thermostable dont la température optimale de fermentation est entre 42-45°C ; ainsi travailler avec des telles souches pourrait être bénéfique pour la SSF par la diminution des coûts reliés au système de refroidissement, la réduction des risques de contamination, l'application du procédé dans des zones tropicales et l'augmentation des rendements (Choudhary et al., 2016).

Le pH affecte aussi la production d'éthanol puisqu'il va avoir une influence sur la contamination bactérienne, le taux de croissance des levures, le taux de fermentation et la formation de co-produits (Mohd Azhar et al., 2017). Le pH optimal pour *S.cerevisiae* est entre 4.0 et 5.0 (Lin et al., 2012). De même, l'augmentation de la concentration en sucres dans le milieu peut provoquer une augmentation du taux de la fermentation ; cependant si la concentration dépasse un certain seuil, le taux de fermentation peut diminuer. Le temps de fermentation affecte la croissance des levures et l'inhibition par le taux d'éthanol. Le taux d'agitation influence la perméabilité des nutriments, le taux de sucres consommés et l'inhibition par l'éthanol. De manière général, le taux du fermenteur décrit est entre 150-200 rpm ; une agitation trop élevée peut limiter le métabolisme des microorganismes. (Zabed et al., 2014)

Les inhibiteurs de la fermentation sont nombreux ; on en distingue deux groupes, ceux qui sont issus de l'étape de prétraitement et ceux qui sont produits en simultanée lors de la fermentation (**Figure 1.40**)(Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Lors des prétraitements, des produits de dégradation de la biomasse lignocellulosique peuvent inhiber la fermentation, notamment les acides faibles, les furanes aldéhydes et les composés phénoliques. Les solvants comme les liquides ioniques sont aussi des inhibiteurs de la fermentation. En présence de fortes concentrations en éthanol, la viabilité des cellules de *S.cerevisiae* peut être compromise. L'éthanol affecte notamment l'intégrité de la membrane plasmidique ; des souches de *S.cerevisiae* génétiquement modifiées pour être plus tolérantes à l'éthanol sont utilisées (Ma and Liu, 2010).



**Figure 1.40** Inhibiteurs de la fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)

### 1.6.2 Configurations d'hydrolyse et fermentation

Plusieurs méthodes d'obtention de l'éthanol peuvent être adoptées selon l'organisation des étapes saccharification et de la fermentation. Parmi ces procédés on retrouve la **SHF** (Separated Hydrolysis and Fermentation ou Hydrolyse et Fermentation Séparées), la **SSF** (Simultaneous saccharification and fermentation ou Saccharification fermentation simultanées), la **SSFC** (Simultaneous saccharification and co-fermentation ou Saccharification co-fermentation simultanées), la **CPB** (Consolidated Bioprocessing ou Bioprocédé consolidé) et la **SSFF** (Simultaneous Saccharification, filtration and fermentation ou Saccharification, filtration, fermentation simultanés (**Figure 1.41**)(Choudhary et al., 2016).

Le procédé en **SHF** consiste à réaliser la saccharification dans un premier temps, et la fermentation dans un deuxième temps. Cette méthode a comme avantage, la réalisation de chacune de ces étapes dans leurs conditions optimales, saccharification à 50°C et fermentation à 30°C. Après la fermentation, les levures peuvent aussi facilement être recyclées, de par leur présence dans la biomasse restante. Cependant, des difficultés peuvent être retrouvées par inhibition rétroactive des enzymes.

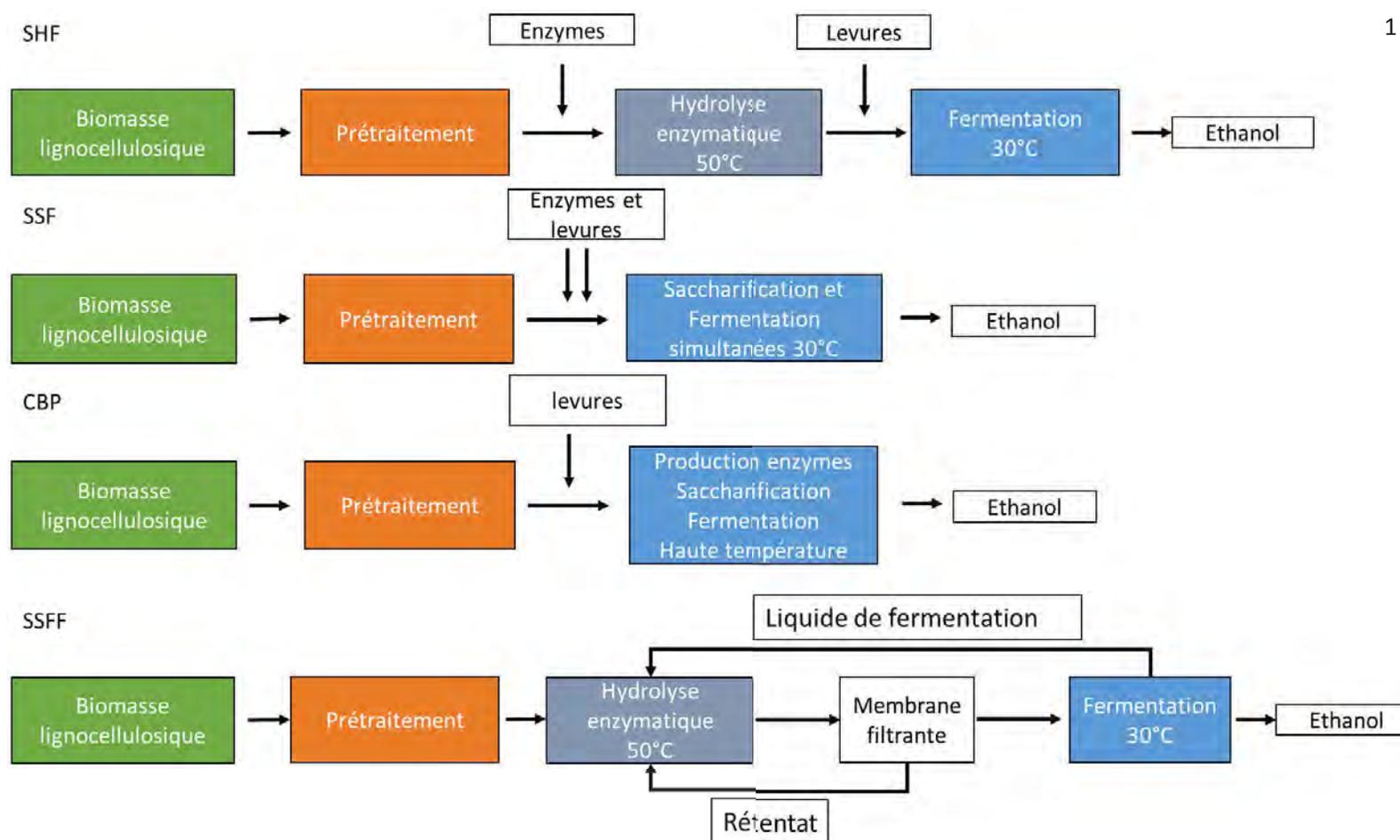
Afin de surmonter cet obstacle, une autre méthode mise en place est la **SSF**, dans laquelle saccharification et fermentation sont menées dans le même réacteur en simultané, généralement à la température optimale de la levure. Au cours, de ce procédé, le glucose est consommé au fur et à mesure qu'il est produit par les enzymes ce qui permet de réduire l'effet d'inhibition rétroactive par le glucose et le cellobiose, mais aussi de réaliser les deux étapes dans un seul réacteur diminuant ainsi le capital d'investissement. La SSF impactée par plusieurs paramètres dont les plus importants sont la consistance, la charge enzymatique, la charge en levure, la température et les inhibiteurs. Un des plus défis pour la SSF est travailler à haute consistance, la production d'éthanol diminue lorsque la

concentration en solides dans le milieu augmente (Olofsson et al., 2008). Pour s'affranchir de ceci deux stratégies ont été mises en place, l'utilisation d'un réacteur en fed-batch ou une étape de pré-hydrolyse avant la fermentation. Comme discuté précédemment travailler en fed-batch apporte des avantages pour la saccharification. En termes de fermentation, ce système permet d'améliorer la viscosité et les transferts de masse dans les réacteurs, et de maintenir des niveaux de glucose stables pour les levures. Une autre stratégie possible est la pré-hydrolyse, pendant laquelle une courte étape (quelques heures) de saccharification à température optimale des enzymes est menée avant l'inoculation des levures. Ce système permet d'initier l'hydrolyse enzymatique et de diminuer la viscosité du milieu (Öhgren et al., 2007b). Une variante du procédé SSF est la **SSCF**, en utilisant des souches pouvant réaliser la fermentation des hexoses et des pentoses.

Quant au **bioprocédé consolidé (CBP)**, il consiste à utiliser un seul microorganisme capable de produire des enzymes pour l'hydrolyse enzymatique et en même temps de fermenter les sucres produits. C'est une méthode économiquement intéressante puis que sa mise en place requière moins d'infrastructures comparé à la SHF ou la SSF. Cependant, sa limitation principale repose sur l'efficacité du microorganisme pour réaliser les deux actions en simultanée (Brethauer and Hanspeter Studer, 2014).

La **SSFF** est un autre procédé intégré dans lequel une membrane filtrante est placée entre le réacteur de saccharification et le fermenteur. La biomasse prétraitée est dans un premier temps soumise à la saccharification. L'hydrolysate est par la suite filtré, le filtrat riche en sucres est dirigé dans le fermenteur. Le retentat et le fermentat sont redirigés dans la cuve de saccharification (Ishola et al., 2015). Cette technique a les avantages de permettre la possibilité de co-fermentation et d'utiliser la totalité de la biomasse ; ses désavantages concernent des problèmes de colmatage retrouvés lors des études à haute consistance.

Le **Tableau 1.14** rassemble les avantages et désavantages de chacun de ces procédés. Dans la présente thèse, c'est la mise en place de la SSCF qui sera visée.



**Figure 1.41** Schéma représentant différents modes de conduite de saccharification et la fermentation utilisés pour la production de bioéthanol lignocellulosique ; SHF :Separated Hydrolysis and Fermentation ou Hydrolyse et Fermentation Séparées ; la SSF :Simultaneous saccharification and fermentation ou Saccharification fermentation simultanée ; la SSFC : Simultaneous saccharification and co-fermentation ou Saccharification co-fermentation simultanées ; la CPB : Consolidated Bioprocessing ou Bioprocédé consolidé et la SSFF : Simultaneous Saccharification, filtration and fermentation ou Saccharification, filtration, fermentation simultanés

**Tableau 1.14** Avantages et désavantages des procédés de mise place de la saccharification et de la fermentation

Procédé	Avantages	Désavantages
<b>SHF</b>	Hydrolyse et fermentation menées à leurs températures optimales	Coût élevé  Long  Inhibition des enzymes par les sucres
<b>SSF</b>	Réductions des coûts de refroidissement  Amélioration de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique  Réduction du risque de contamination  Evaporation en continue de l'éthanol dans le milieu de culture à pression faible	Température optimale des enzymes hydrolytiques et des levures différentes  Réduction de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique due à la température  Adsorption des exoglucanases perturbée par les concentrations d'éthanol supérieures à 0,2M, l'efficacité hydrolytique diminuée  Levures pouvant être affectées par le cocktail enzymatique  Difficultés pour recycler les microorganismes
<b>SSCF</b>	Utilisation entière du substrat  Réduction des coûts  Production en éthanol plus élevée  Elimination en continu des produits lors de saccharification et inhibition rétroactive	Fermentation du xylose en conditions aérobies  Affinité plus élevée des transporteurs moléculaires pour le glucose que le xylose

<b>CBP</b>	<p>Réduction de l'investissement</p> <p>Elimination de l'approvisionnement extérieure des enzymes</p> <p>Un seul réacteur pour saccharification et fermentation</p> <p>Simplification des opérations</p> <p>Réduction des risques de contamination</p> <p>Diminution de l'inhibition rétroactive des cellulases</p>	<p>Mélange affectée par la haute consistance</p> <p>Développement difficile des microorganismes capables de produire des enzymes et de réaliser la fermentation</p>
<b>SSFF</b>	<p>Amélioration des performances cellulaires</p> <p>L'utilisation complète de la biomasse facilitée</p> <p>Hydrolyse et fermentation est menée à des conditions optimales</p>	<p>Colmatage des filtres à membrane à haute consistance</p>

---

SHF :Separated Hydrolysis and Fermentation ou Hydrolyse et Fermentation Séparées ; la SSF :Simultaneous saccharification and fermentation ou Saccharification fermentation simultanée ; la SSFC : Simoultaneous saccharification and co-fermentation ou Saccharification co-fermentation simultanées ; la CPB : Consolidated Bioprocessing ou Bioprocédé consolidé et la SSFF : Simoultaneaous Saccharification, filtration and fermentation ou Saccharification, filtration, fermentation simultanés

---

### 1.7 Conclusion du chapitre

Le contexte global actuel évoqué dans ce chapitre met en évidence le besoin de la mise en place de nouvelles technologies visant à la commercialisation de sources d'énergie renouvelables et pouvant assurer leur durabilité. Le bioéthanol de deuxième génération est une ressource énergétique intéressante et qui potentiellement peut atteindre la durabilité. La barrière technologique forme aujourd'hui un des freins majeurs pour sa commercialisation et sa compétitivité vis-à-vis du pétrole. Sa complexité technologique de production à partir de ressources lignocellulosiques est mise en exergue dans ce chapitre. D'une part, le processus compte avec des nombreuses étapes consécutives dont les conditions vont s'influencer l'une par rapport à l'autre. D'autre part, la biomasse lignocellulosique est une matière brute complexe, hétérogène et récalcitrante, dont la destructuration est particulièrement difficile à atteindre et à analyser.

Le projet BABETHANOL a permis la mise en place d'un procédé de destructuration enzymatique de la biomasse lignocellulosique dont les principales actions sont de nature chimique et physique. Le prétraitement est réalisé en continue dans une extrudeur bi-vis, avec un traitement alcalin, une neutralisation, filtration et imprégnation enzymatique. Ce projet s'est abouti avec des études économiques et environnementales du procédé dont leur but a été de repérer les principales barrières du procédé. Ainsi il a été question du coût et de traitement des effluents employés dans les étapes de prétraitement alcalin et neutralisation.

Quant à l'étape d'imprégnation enzymatique en extrusion bi-vis ou bioextrusion, cette phase constitue une approche nouvelle et très peu étudiée. Sa mise en place constitue un point crucial pour atteindre un procédé en continue, intégrant saccharification et fermentation, puis qu'en intégrant la solution enzymatique dans l'extrudeur, il est possible d'obtenir en sortie d'extrudeur un substrat prêt à la poursuite de la saccharification en réacteur. Les conditions employées lors de cette étape de bioextrusion sont déterminantes afin de parvenir à des rendements et concentrations en sucres fermentescibles et donc éthanol. Ces conditions de bioextrusion doivent aussi prendre en compte les limites liées aux contraintes d'hydrolyse à haute consistance et de prix des enzymes.

A partir de ce chapitre, deux problématiques sont traitées dans ce manuscrit (**Figure 1.42**):

- **Comment diminuer le coût relié à l'utilisation de produits chimiques pour le prétraitement alcalin ?**
- **Quelles conditions de bioextrusion et hydrolyse enzymatique employer dans une configuration de procédé de prétraitement-saccharification –fermentation intégrés ?**

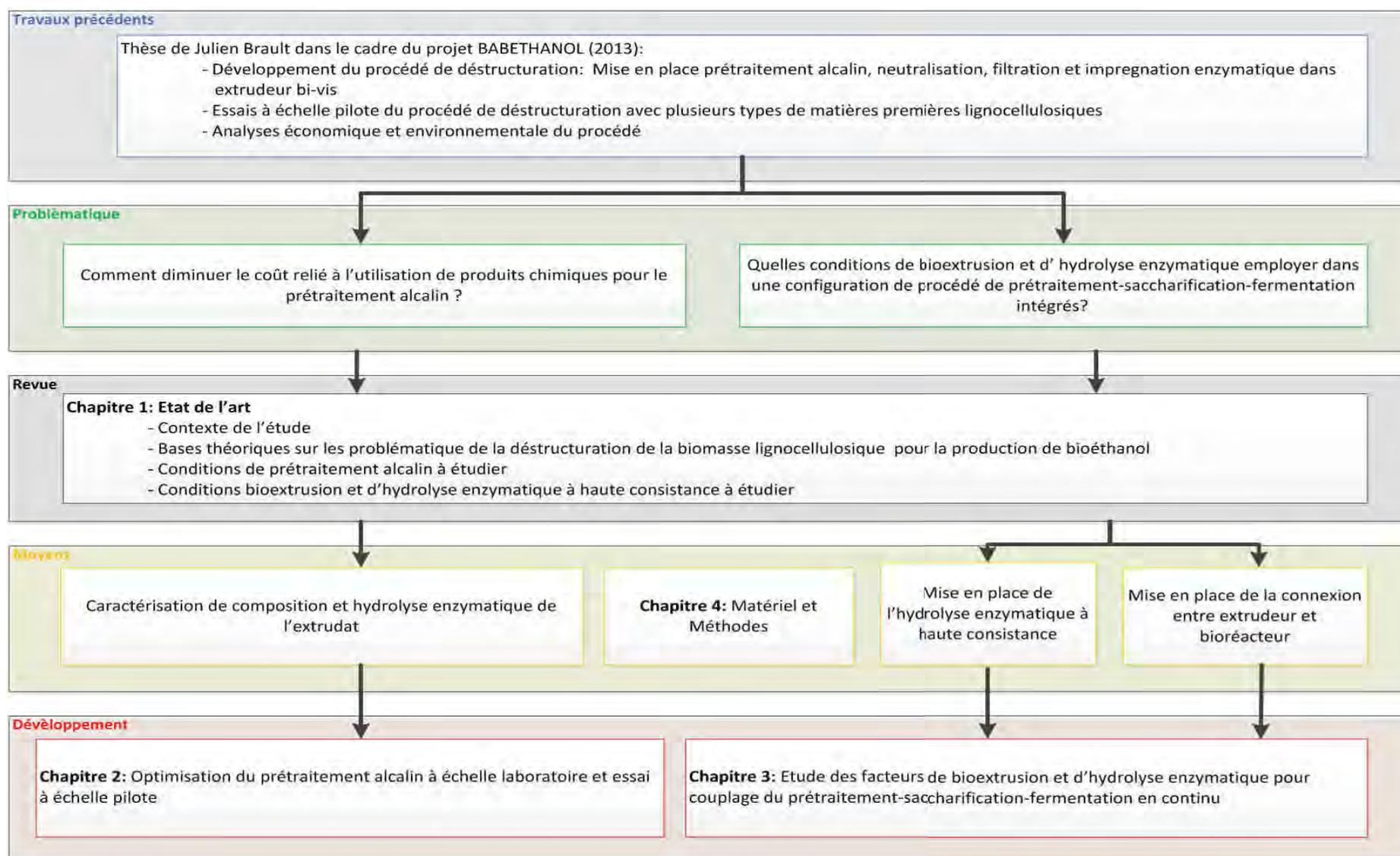


Figure 1.42 Schéma illustratif de l'organisation de ce travail de thèse

## 1.8 Références

- Abuja, P.M., Schmuck, M., Pilz, I., Tomme, P., Claeysens, M., Esterbauer, H., 1988. Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *trichoderma reesei*. *Eur Biophys J* 15, 339–342. <https://doi.org/10.1007/BF00254721>
- Agarwal, A.K., 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science* 33, 233–271. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2006.08.003>
- Alam, M.S., Kaur, J., Khaira, H., Gupta, K., 2016. Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56, 445–473. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779568>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives* 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Anderson, N.A., Tobimatsu, Y., Ciesielski, P.N., Ximenes, E., Ralph, J., Donohoe, B.S., Ladisch, M., Chapple, C., 2015. Manipulation of Guaiacyl and Syringyl Monomer Biosynthesis in an *Arabidopsis* Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Mutant Results in Atypical Lignin Biosynthesis and Modified Cell Wall Structure. *The Plant Cell* 27, 2195–2209. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00373>
- Arantes, V., Saddler, J.N., 2011. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels* 4, 3. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-3>
- Arantes, V., Saddler, J.N., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., 2017. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z>
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52, 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X., 2013. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresource Technology* 134, 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.169>
- Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon, R.A.D., Vries, H. de, Luque, R., 2014. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *RSC Adv.* 4, 48109–48127. <https://doi.org/10.1039/C4RA07568D>
- Beeson, W.T., Vu, V.V., Span, E.A., Phillips, C.M., Marletta, M.A., 2015. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases, in: Kornberg, R.D. (Ed.), *Annual Review of Biochemistry*, Vol 84. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 923–946.
- Benjamin, Y., Cheng, H., Görgens, J.F., 2013. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products* 51, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.067>
- Berlin, A., 2013. No Barriers to Cellulose Breakdown. *Science* 342, 1454–1456. <https://doi.org/10.1126/science.1247697>
- Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 126, 49–59. <https://doi.org/10.1007/s12010-005-0005-5>

- Bichot, A., Delgenès, J.-P., Méchin, V., Carrère, H., Bernet, N., García-Bernet, D., 2018. Understanding biomass recalcitrance in grasses for their efficient utilization as biorefinery feedstock. *Rev Environ Sci Biotechnol* 17, 707–748. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9485-y>
- Bischof, R.H., Ramoni, J., Seiboth, B., 2016. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories* 15, 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>
- Black, R., Arnell, N.W., Adger, W.N., Thomas, D., Geddes, A., 2013. Migration, immobility and displacement outcomes following extreme events. *Environmental Science & Policy, Global environmental change, extreme environmental events and “environmental migration”*: exploring the connections 27, S32–S43. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2012.09.001>
- Bonawitz, N.D., Kim, J.I., Tobimatsu, Y., Ciesielski, P.N., Anderson, N.A., Ximenes, E., Maeda, J., Ralph, J., Donohoe, B.S., Ladisch, M., Chapple, C., 2014. Disruption of Mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient *Arabidopsis* mutant. *Nature* 509, 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature13084>
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 382, 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bouvier, J.-M., Campanella, O.H., 2014. *Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials*. John Wiley & Sons.
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15, 550–583. <https://doi.org/10.1039/C2GC36364J>
- Brandt-Talbot, A., Gschwend, F.J.V., Fennell, P.S., Lammens, T.M., Tan, B., Weale, J., Hallett, J.P., 2017. An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. *Green Chem.* 19, 3078–3102. <https://doi.org/10.1039/C7GC00705A>
- Brault, J., 2013. Développement d'un procédé innovant de dégradation enzymatique des parois végétales pour la production de bioéthanol seconde génération (thesis). Toulouse, INPT.
- Brethauer, S., Hanspeter Studer, M., 2014. Consolidated bioprocessing of lignocellulose by a microbial consortium. *Energy & Environmental Science* 7, 1446–1453. <https://doi.org/10.1039/C3EE41753K>
- Bura, R., Chandra, R., Saddler, J., 2009. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnology Progress* 25, 315–322. <https://doi.org/10.1002/btpr.98>
- Buranov, A.U., Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28, 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>
- Busse-Wicher, M., Gomes, T.C.F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N.J., Bolam, D.N., Skaf, M.S., Dupree, P., 2014. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 79, 492–506. <https://doi.org/10.1111/tpj.12575>
- Cai, D., Li, P., Luo, Z., Qin, P., Chen, C., Wang, Y., Wang, Z., Tan, T., 2016. Effect of dilute alkaline pretreatment on the conversion of different parts of corn stalk to fermentable sugars and its application in acetone–butanol–ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 211, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.076>
- Cardona, C.A., Sánchez, Ó.J., 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98, 2415–2457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., Delmer, D.P., 1979. Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* 205, 1144–1147. <https://doi.org/10.1126/science.205.4411.1144>
- Carroll, A., Somerville, C., 2009. Cellulosic Biofuels. *Annual Review of Plant Biology* 60, 165–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092125>

- Carvajal, D., Marchisio, D.L., Bensaid, S., Fino, D., 2012. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomasses via CFD and Experiments. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 7518–7525. <https://doi.org/10.1021/ie201673t>
- Cayetano, R.D.A., Kim, T.H., 2018. Two-stage processing of *Miscanthus giganteus* using anhydrous ammonia and hot water for effective xylan recovery and improved enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 255, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.135>
- Challinor, A.J., Watson, J., Lobell, D.B., Howden, S.M., Smith, D.R., Chhetri, N., 2014. A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation. *Nature Climate Change* 4, 287–291. <https://doi.org/10.1038/nclimate2153>
- Chandel, A.K., Garlapati, V.K., Singh, A.K., Antunes, F.A.F., da Silva, S.S., 2018. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology* 264, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
- Chapple, C., Ladisch, M., Meilan, R., 2007. Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nature Biotechnology* 25, 746–748. <https://doi.org/10.1038/nbt0707-746>
- Chavez, E., Conway, G., Ghil, M., Sadler, M., 2015. An end-to-end assessment of extreme weather impacts on food security. *Nature Climate Change* 5, 997–1001. <https://doi.org/10.1038/nclimate2747>
- Chen, C.-T.A., Lui, H.-K., Hsieh, C.-H., Yanagi, T., Kosugi, N., Ishii, M., Gong, G.-C., 2017. Deep oceans may acidify faster than anticipated due to global warming. *Nature Climate Change* 7, 890. <https://doi.org/10.1038/s41558-017-0003-y>
- Chen, F., Dixon, R.A., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* 25, 759–761. <https://doi.org/10.1038/nbt1316>
- Chen, H.-Z., Liu, Z.-H., 2017. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. *Engineering in Life Sciences* 17, 489–499. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600102>
- Chen, X., Zhang, X., Church, J.A., Watson, C.S., King, M.A., Monselesan, D., Legresy, B., Harig, C., 2017. The increasing rate of global mean sea-level rise during 1993–2014. *Nature Climate Change* 7, 492–495. <https://doi.org/10.1038/nclimate3325>
- Cherubini, F., Ulgiati, S., 2010. Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study. *Applied Energy* 87, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.08.024>
- Choi, C.H., Oh, K.K., 2012. Application of a continuous twin screw-driven process for dilute acid pretreatment of rape straw. *Bioresource Technology* 110, 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.075>
- Choi, W.-I., Oh, K.-K., Park, J.-Y., Lee, J.-S., 2014. Continuous sodium hydroxide-catalyzed pretreatment of empty fruit bunches (EFB) by continuous twin-screw-driven reactor (CTSR). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89, 290–296. <https://doi.org/10.1002/jctb.4119>
- Choudhary, J., Singh, S., Nain, L., 2016. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology* 21, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>
- Côté, W.A., 1977. Wood Ultrastructure in Relation to Chemical Composition, in: Loewus, F.A., Runeckles, V.C. (Eds.), *The Structure, Biosynthesis, and Degradation of Wood, Recent Advances in Phytochemistry*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8873-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8873-3_1)
- Davison, B.H., Parks, J., Davis, M.F., Donohoe, B.S., 2013. Plant Cell Walls: Basics of Structure, Chemistry, Accessibility and the Influence on Conversion, in: *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 23–38. <https://doi.org/10.1002/9780470975831.ch3>
- Dien, B.S., Li, X.-L., Iten, L.B., Jordan, D.B., Nichols, N.N., O'Bryan, P.J., Cotta, M.A., 2006. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1137–1144. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.022>

- Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering* 101, 913–925. <https://doi.org/10.1002/bit.21959>
- Donohoe, B.S., Resch, M.G., 2015. Mechanisms employed by cellulase systems to gain access through the complex architecture of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Chemical Biology, Energy • Mechanistic biology* 29, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.014>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., Ballesteros, M., 2014. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresource Technology* 158, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.041>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2013. Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 48, 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.003>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renewable Energy* 114, 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>
- Duque, A., Manzanares, P., González, A., Ballesteros, M., 2018. Study of the Application of Alkaline Extrusion to the Pretreatment of Eucalyptus Biomass as First Step in a Bioethanol Production Process. *Energies* 11, 2961. <https://doi.org/10.3390/en11112961>
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T., 2005. Hemicellulose, in: Heinze, T. (Ed.), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use, Advances in Polymer Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–67. <https://doi.org/10.1007/b136816>
- Egüés, I., Sanchez, C., Mondragon, I., Labidi, J., 2012. Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology* 103, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.139>
- Evon, P., Vandenbossche, V., Candy, L., Pontalier, P.-Y., Rouilly, A., 2018. Twin-Screw Extrusion: A Key Technology for the Biorefinery, in: *Biomass Extrusion and Reaction Technologies: Principles to Practices and Future Potential*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 25–44. <https://doi.org/10.1021/bk-2018-1304.ch002>
- Felby, C., Thygesen, L.G., Kristensen, J.B., Jørgensen, H., Elder, T., 2008. Cellulose–water interactions during enzymatic hydrolysis as studied by time domain NMR. *Cellulose* 15, 703–710. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9222-8>
- Fengel, D., Wegener, G., 2011. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- Fernandes, A.N., Thomas, L.H., Altaner, C.M., Callow, P., Forsyth, V.T., Apperley, D.C., Kennedy, C.J., Jarvis, M.C., 2011. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E1195–E1203. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108942108>
- Ferreira, S., Duarte, A.P., Ribeiro, M.H.L., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal* 45, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.03.012>
- Fockink, D.H., Urio, M.B., Chiarello, L.M., Sánchez, J.H., Ramos, L.P., 2016. Principles and Challenges Involved in the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials at High Total Solids, in: Soccol, C.R., Brar, S.K., Faulds, C., Ramos, L.P. (Eds.), *Green Fuels Technology: Biofuels, Green Energy and Technology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 147–173. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_7)
- Fritz, C., Ferrer, A., Salas, C., Jameel, H., Rojas, O.J., 2015. Interactions between Cellulolytic Enzymes with Native, Autohydrolysis, and Technical Lignins and the Effect of a Polysorbate Amphiphile in Reducing Nonproductive Binding. *Biomacromolecules* 16, 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01203>

- Galbe, M., Zacchi, G., 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 41–65. [https://doi.org/10.1007/10\\_2007\\_070](https://doi.org/10.1007/10_2007_070)
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh- und Werkstoff* 57, 191–202. <https://doi.org/10.1007/s001070050039>
- Gatt, E., Rigal, L., Vandebossche, V., 2018. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review. *Industrial Crops and Products* 122, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.069>
- Ghosh, S., Chowdhury, R., Bhattacharya, P., 2017. Sustainability of cereal straws for the fermentative production of second generation biofuels: A review of the efficiency and economics of biochemical pretreatment processes. *Applied Energy* 198, 284–298. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.091>
- Gierer, J., 2009. The Chemistry of Delignification. A General Concept. *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 36, 43–51. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1982.36.1.43>
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Giuntoli, J., 2018. Final recast Renewable Energy Directive for 2021-2030 in the European Union 6.
- Glasser, W.G., Atalla, R.H., Blackwell, J., Malcolm Brown, R., Burchard, W., French, A.D., Klemm, D.O., Nishiyama, Y., 2012. About the structure of cellulose: debating the Lindman hypothesis. *Cellulose* 19, 589–598. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9691-7>
- Gu, T., Held, M.A., Faik, A., 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. *Environmental Technology* 34, 1735–1749. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.809777>
- Guo, F., Shi, W., Sun, W., Li, X., Wang, F., Zhao, J., Qu, Y., 2014. Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. *Biotechnology for Biofuels* 7, 38. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-38>
- Guo, M., Song, W., Buhain, J., 2015. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42, 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.013>
- Gupta, R., Lee, Y.Y., 2009. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 1570–1581. <https://doi.org/10.1002/bit.22195>
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realff, M.J., Bommarius, A.S., 2010. Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *The FEBS Journal* 277, 1571–1582. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x>
- Hallegatte, S., Rozenberg, J., 2017. Climate change through a poverty lens. *Nature Climate Change* 7, 250–256. <https://doi.org/10.1038/nclimate3253>
- Hayashi, K., Ono, K., Kajjura, M., Sudo, S., Yonemura, S., Fushimi, A., Saitoh, K., Fujitani, Y., Tanabe, K., 2014. Trace gas and particle emissions from open burning of three cereal crop residues: Increase in residue moistness enhances emissions of carbon monoxide, methane, and particulate organic carbon. *Atmospheric Environment* 95, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.06.023>
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H., Kanae, S., 2013. Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change* 3, 816–821. <https://doi.org/10.1038/nclimate1911>
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D., 2008. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology* 99, 8940–8948. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.015>

- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G., 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5, 45. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>
- Humbird, D., Mohagheghi, A., Dowe, N., Schell, D.J., 2010. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover. *Biotechnology Progress* 26, 1245–1251. <https://doi.org/10.1002/btpr.441>
- Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J.F., Chang, H., Jameel, H., 2002. Studies on the Effect of Ball Milling on Lignin Structure Using a Modified DFRC Method. *J. Agric. Food Chem.* 50, 129–135. <https://doi.org/10.1021/jf010870f>
- IRENA, 2016. Innovation Outlook Advanced Biofuels 2016 Summary | Biofuel | Gasification.
- Ishola, M.M., Brandberg, T., Taherzadeh, M.J., 2015. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. *Biomass and Bioenergy* 77, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.021>
- Isikgor, F.H., Becer, C.R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* 6, 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M.N., Ludquist, K., Taherzadeh, M.J., 2011. BIOLOGICAL PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSES WITH WHITE-ROT FUNGI AND ITS APPLICATIONS: A REVIEW. *BioResources* 6, 5224-5259–5259. <https://doi.org/10.15376/biores.6.4.5224-5259>
- Jacquet, N., Quiévy, N., Vanderghem, C., Janas, S., Blecker, C., Wathélet, B., Devaux, J., Paquot, M., 2011. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polymer Degradation and Stability* 96, 1582–1588. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.05.021>
- Jiang, W., Peng, H., Li, H., Xu, J., 2014. Effect of acetylation/deacetylation on enzymatic hydrolysis of corn stalk. *Biomass and Bioenergy* 71, 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.09.028>
- Johnston, A.S.A., Sibly, R.M., 2018. The influence of soil communities on the temperature sensitivity of soil respiration. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 1597–1602. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0648-6>
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007a. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1, 119–134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Jørgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007b. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 862–870. <https://doi.org/10.1002/bit.21115>
- Journal officiel de l'Union européenne, C 160, 19 juin 2010, n.d.
- Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2010. Effect of Extruder Parameters and Moisture Content of Switchgrass, Prairie Cord Grass on Sugar Recovery from Enzymatic Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 1785–1803. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8959-3>
- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S.G., Toksoy Oner, E., Kirdar, B., 2012. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy* 45, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.013>
- Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Adjallé, K., Barnabé, S., Beauregard, M., 2018. Determination of optimal biomass pretreatment strategies for biofuel production: investigation of relationships between surface-exposed polysaccharides and their enzymatic conversion using carbohydrate-binding modules. *Biotechnology for Biofuels* 11, 144. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1145-5>
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology, Pretreatment of Biomass* 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>

- Kim, T.H., Choi, C.H., Oh, K.K., 2013. Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulfuric acid-assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* 130, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.125>
- Kim, T.H., Lee, Y.Y., 2007. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. *Appl Biochem Biotechnol* 137, 81–92. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9041-7>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Ko, J.K., Kim, Y., Ximenes, E., Ladisch, M.R., 2015. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 112, 252–262. <https://doi.org/10.1002/bit.25349>
- Kubicek, C.P., 1992. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation, in: *Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–27. <https://doi.org/10.1007/BFb0008754>
- Kuhar, S., Nair, L.M., Kuhad, R.C., 2008. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol. *Can. J. Microbiol.* 54, 305–313. <https://doi.org/10.1139/W08-003>
- Kumar, R., Hu, F., Sannigrahi, P., Jung, S., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E., 2013. Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 737–753. <https://doi.org/10.1002/bit.24744>
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 100, 3948–3962. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2008. An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.12.005>
- Kumari, R., Pramanik, K., 2013. Bioethanol Production from *Ipomoea Carnea* Biomass Using a Potential Hybrid Yeast Strain. *Appl Biochem Biotechnol* 171, 771–785. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0398-5>
- Lal, R., 2009. Soil quality impacts of residue removal for bioethanol production. *Soil and Tillage Research, Soil Management for Sustainability* 102, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.07.003>
- Larsen, J., Østergaard Petersen, M., Thirup, L., Wen Li, H., Krogh Iversen, F., 2008. The IBUS Process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. *Chem. Eng. Technol.* 31, 765–772. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800048>
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 124, 1081–1099. <https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1081>
- Lee, J.-W., Gwak, K.-S., Park, J.-Y., Park, M.-J., Choi, D.-H., Kwon, M., Choi, I.-G., 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J. Microbiol.* 45, 485–491.
- Lee, S.-H., Inoue, S., Teramoto, Y., Endo, T., 2010a. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: Effect of hot-compressed water treatment. *Bioresource Technology* 101, 9645–9649. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.068>
- Lee, S.-H., Inoue, S., Teramoto, Y., Endo, T., 2010b. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: Effect of hot-compressed water treatment. *Bioresource Technology* 101, 9645–9649. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.068>

- Leggett, L.M.W., Ball, D.A., 2012. The implication for climate change and peak fossil fuel of the continuation of the current trend in wind and solar energy production. *Energy Policy* 41, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.11.022>
- Li, X., Zheng, Y., 2017. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnology Advances* 35, 466–489. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.010>
- Liguori, R., Soccol, C.R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Woiciechowski, A.L., Faraco, V., 2015. Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. *Energies* 8, 2575–2586. <https://doi.org/10.3390/en8042575>
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., Kong, H., 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy* 47, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., Wang, H., 2018. Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production. *Fuel* 221, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.088>
- Lu, H., Liu, S., Zhang, M., Meng, F., Shi, X., Yan, L., 2016. Investigation of the Strengthening Process for Liquid Hot Water Pretreatments. *Energy Fuels* 30, 1103–1108. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02658>
- Ma, M., Liu, Z.L., 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 829–845. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2594-3>
- MacFadden, D.R., McGough, S.F., Fisman, D., Santillana, M., Brownstein, J.S., 2018. Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change* 8, 510. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>
- Malcolm Brown, R., Saxena, I.M., Kudlicka, K., 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science* 1, 149–156. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80050-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80050-1)
- Markevičius, A., Katinas, V., Perednis, E., Tamašauskienė, M., 2010. Trends and sustainability criteria of the production and use of liquid biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 3226–3231. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.015>
- Marriott, P.E., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J., 2016. Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytol.* 209, 1366–1381. <https://doi.org/10.1111/nph.13684>
- Martin-Sampedro, R., Martin, J.A., Eugenio, M.E., Revilla, E., Villar, J.C., 2011. STEAM EXPLOSION TREATMENT OF EUCALYPTUS GLOBULUS WOOD: INFLUENCE OF OPERATIONAL CONDITIONS ON CHEMICAL AND STRUCTURAL MODIFICATIONS. *BioResources* 6, 4922-4935–4935. <https://doi.org/10.15376/biores.6.4.4922-4935>
- Mcdonough, T., 1993. The Chemistry of Organosolv Delignification. *TAPPI J.* 76, 186–193.
- Medronho, B., Lindman, B., 2014. Competing forces during cellulose dissolution: From solvents to mechanisms. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 19, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.12.001>
- Medronho, B., Romano, A., Miguel, M.G., Stigsson, L., Lindman, B., 2012. Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. *Cellulose* 19, 581–587. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9644-6>
- Mendes, F.M., Siqueira, G., Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2011. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. *Biotechnology Progress* 27, 395–401. <https://doi.org/10.1002/btpr.553>
- Meng, X., Ragauskas, A.J., 2014. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology • Environmental biotechnology* 27, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.014>
- Modenbach, A., 2013. Sodium hydroxide pretreatment of corn stover and subsequent enzymatic hydrolysis: An investigation of yields, kinetic modeling and glucose recovery. Theses and Dissertations--Biosystems and Agricultural Engineering.

- Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy* 56, 526–544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031>
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A., Rodrigues, K.F., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* 10, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Mohr, A., Raman, S., 2013. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy* 63, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.033>
- Montagne, X., Porot, P., Aymard, C., Querleu, C., Bouter, A., Lorne, D., Cadoret, J.-P., Lombaert-Valot, I., Petillon, O., 2013. Algogroup: Towards a Shared Vision of the Possible Deployment of Algae to Biofuels. *Oil Gas Sci. Technol.* 68, 875–898. <https://doi.org/10.2516/ogst/2013164>
- Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., Aroca, G., 2015. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42, 1349–1361. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.097>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Motte, J.-C., Escudié, R., Beaufils, N., Steyer, J.-P., Bernet, N., Delgenès, J.-P., Dumas, C., 2014. Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Industrial Crops and Products* 52, 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.038>
- Murakami, H., Vecchi, G.A., Underwood, S., 2017. Increasing frequency of extremely severe cyclonic storms over the Arabian Sea. *Nature Climate Change* 7, 885. <https://doi.org/10.1038/s41558-017-0008-6>
- Mussatto, S.I., Dragone, G.M., 2016. Chapter 1 - Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development, in: Mussatto, Solange I. (Ed.), *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00001-3>
- Narayanaswamy, N., Faik, A., Goetz, D.J., Gu, T., 2011. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. *Bioresource Technology* 102, 6995–7000. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.052>
- Ni, Y.G., vanHeiningen, A.R.P., 1997. The swelling of pulp fibers derived from the ethanol-based organosolv process. *TAPPI J.* 80, 211–213.
- Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., Zacchi, G., 2007a. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 98, 2503–2510. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.003>
- Öhgren, K., Vehmaanperä, J., Siika-Aho, M., Galbe, M., Viikari, L., Zacchi, G., 2007b. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.014>
- Oliveira, D.M. de, Finger-Teixeira, A., Mota, T.R., Salvador, V.H., Moreira-Vilar, F.C., Molinari, H.B.C., Mitchell, R.A.C., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., Santos, W.D. dos, 2015. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal* 13, 1224–1232. <https://doi.org/10.1111/pbi.12292>
- Olivier-Bourbigou, H., Magna, L., Morvan, D., 2010. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Applied Catalysis A: General* 373, 1–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2009.10.008>
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G., 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* 1, 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- O'SULLIVAN, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>

- Oumer, A.N., Hasan, M.M., Baheta, A.T., Mamat, R., Abdullah, A.A., 2018. Bio-based liquid fuels as a source of renewable energy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 88, 82–98. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.022>
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 74, 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Papa, G., Varanasi, P., Sun, L., Cheng, G., Stavila, V., Holmes, B., Simmons, B.A., Adani, F., Singh, S., 2012. Exploring the effect of different plant lignin content and composition on ionic liquid pretreatment efficiency and enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus* L. mutants. *Bioresource Technology* 117, 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.065>
- Pareek, N., Gillgren, T., Jönsson, L.J., 2013. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresource Technology* 148, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.121>
- Parmar, I., Rupasinghe, H.P.V., 2013. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 130, 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.084>
- Pattyn, F., Ritz, C., Hanna, E., Asay-Davis, X., DeConto, R., Durand, G., Favier, L., Fettweis, X., Goelzer, H., Golledge, N.R., Munneke, P.K., Lenaerts, J.T.M., Nowicki, S., Payne, A.J., Robinson, A., Seroussi, H., Trusel, L.D., Broeke, M. van den, 2018. The Greenland and Antarctic ice sheets under 1.5 °C global warming. *Nature Climate Change* 8, 1053. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0305-8>
- Phisalaphong, M., Srirattana, N., Tanthapanichakoon, W., 2006. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 28, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.039>
- Phitsuwan, P., Sakka, K., Ratanakhanokchai, K., 2013. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy* 58, 390–405. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.027>
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N., Joshi, H.C., 2007. Ethanol Production from Sweet Sorghum Syrup for Utilization as Automotive Fuel in India. *Energy Fuels* 21, 2415–2420. <https://doi.org/10.1021/ef060328z>
- Qin, C., Clarke, K., Li, K., 2014. Interactive forces between lignin and cellulase as determined by atomic force microscopy. *Biotechnology for Biofuels* 7, 65. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-65>
- Qing, Q., Yang, B., Wyman, C.E., 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology* 101, 9624–9630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.137>
- Rahikainen, J.L., Martin-Sampedro, R., Heikkinen, H., Rovio, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., Rojas, O.J., Kruus, K., 2013. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresource Technology* 133, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.075>
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W., 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* 3, 29–60. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology* 34, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>
- Roberts, K.M., Lavenson, D.M., Tozzi, E.J., McCarthy, M.J., Jeoh, T., 2011. The effects of water interactions in cellulose suspensions on mass transfer and saccharification efficiency at high solids loadings. *Cellulose* 18, 759–773. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9509-z>
- Roche, C.M., Dibble, C.J., Knutsen, J.S., Stickel, J.J., Liberatore, M.W., 2009. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnology and Bioengineering* 104, 290–300. <https://doi.org/10.1002/bit.22381>

- Rogalinski, T., Ingram, T., Brunner, G., 2008. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids* 47, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.05.003>
- Sanderson, K., 2011. Lignocellulose: A chewy problem. *Nature* 474, S12–S14. <https://doi.org/10.1038/474S012a>
- Schleussner, C.-F., Rogelj, J., Schaeffer, M., Lissner, T., Licker, R., Fischer, E.M., Knutti, R., Levermann, A., Frieler, K., Hare, W., 2016. Science and policy characteristics of the Paris Agreement temperature goal. *Nature Climate Change* 6, 827–835. <https://doi.org/10.1038/nclimate3096>
- Shuba, E.S., Kifle, D., 2018. Microalgae to biofuels: “Promising” alternative and renewable energy, review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 81, 743–755. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.042>
- Silva, G.G.D., Couturier, M., Berrin, J.-G., Buléon, A., Rouau, X., 2012. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology* 103, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073>
- Silva, R.A., West, J.J., Lamarque, J.-F., Shindell, D.T., Collins, W.J., Faluvegi, G., Folberth, G.A., Horowitz, L.W., Nagashima, T., Naik, V., Rumbold, S.T., Sudo, K., Takemura, T., Bergmann, D., Cameron-Smith, P., Doherty, R.M., Josse, B., MacKenzie, I.A., Stevenson, D.S., Zeng, G., 2017. Future global mortality from changes in air pollution attributable to climate change. *Nature Climate Change* 7, 647–651. <https://doi.org/10.1038/nclimate3354>
- Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P., Pandey, A., 2016. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview. *Renewable Energy, Special Issue: New Horizons in Biofuels Production and Technologies* 98, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.057>
- Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N.R., 2014. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel* 116, 699–702. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.072>
- Singh, J., Suhag, M., Dhaka, A., 2015. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers* 117, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
- Smith, M.R., Myers, S.S., 2018. Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> emissions on global human nutrition. *Nature Climate Change* 8, 834. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0253-3>
- Socha, A.M., Parthasarathi, R., Shi, J., Pattathil, S., Whyte, D., Bergeron, M., George, A., Tran, K., Stavila, V., Venkatachalam, S., Hahn, M.G., Simmons, B.A., Singh, S., 2014. Efficient biomass pretreatment using ionic liquids derived from lignin and hemicellulose. *PNAS* 111, E3587–E3595. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405685111>
- Solomon, B.D., 2010. Biofuels and sustainability, in: Limburg, K., Costanza, R. (Eds.), *Ecological Economics Reviews*. Wiley-Blackwell, Malden, pp. 119–134.
- Sorda, G., Banse, M., Kemfert, C., 2010. An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy, Energy Efficiency Policies and Strategies with regular papers.* 38, 6977–6988. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.06.066>
- Srinivasan, N., Ju, L.-K., 2010. Pretreatment of guayule biomass using supercritical carbon dioxide-based method. *Bioresource Technology* 101, 9785–9791. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.069>
- Sun, R., 2010. *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. Elsevier.
- Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Siika-aho, M., Niku-Paavola, M.-L., Viikari, L., Buchert, J., 2000. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose* 7, 189–209. <https://doi.org/10.1023/A:1009280109519>
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives* 101, 4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>

- Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies 96, 2014–2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.016>
- Tomei, J., Helliwell, R., 2016. Food versus fuel? Going beyond biofuels. *Land Use Policy* 56, 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2015.11.015>
- Tye, Y.Y., Lee, K.T., Wan Abdullah, W.N., Leh, C.P., 2016. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 60, 155–172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.072>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez-Melendez, O., Evon, P., Barzana, E., Vilarem, G., Rigal, L., 2016. Suitability assessment of a continuous process combining thermo-mechano-chemical and bio-catalytic action in a single pilot-scale twin-screw extruder for six different biomass sources. *Bioresource Technology* 211, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.072>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014a. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano-chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products* 55, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Industrial Crops and Products* 67, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Vandenbossche, V., Doumeng, C., Rigal, L., 2014b. Thermomechanical and Thermo-mechano-chemical Pretreatment of Wheat Straw using a Twin-screw Extruder. *BioResources* 9, 1519–1538. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.1519-1538>
- Vermaas, J.V., Petridis, L., Qi, X., Schulz, R., Lindner, B., Smith, Jeremy.C., 2015. Mechanism of lignin inhibition of enzymatic biomass deconstruction. *Biotechnology for Biofuels* 8, 217. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0379-8>
- Viamajala, S., Donohoe, B.S., Decker, S.R., Vinzant, T.B., Selig, M.J., Himmel, M.E., Tucker, M.P., 2010. Heat and Mass Transport in Processing of Lignocellulosic Biomass for Fuels and Chemicals, in: Singh, O.V., Harvey, S.P. (Eds.), *Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–18. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3295-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3295-9_1)
- Vilarem, G., Rigal, L., Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez Luna, M., Hernandez Melendez, O., Vivaldo Lima, E., Barzana Garcia, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Duque, A., Siika-Aho, M., Uusitalo, J.M., Mata-Segreda, J., Guillouet, S., Lombard, E., Cameleyre, X., 2013. Procédé de traitement enzymatique d'une matière ligno-cellulosique solide. WO2013182827A8.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S., 2014. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2, 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>
- Wagner, J.R., Mount, E.M., Giles, H.F., 2014. 9 - Twin Screw Extrusion Process, in: Wagner, J.R., Mount, E.M., Giles, H.F. (Eds.), *Extrusion (Second Edition)*, *Plastics Design Library*. William Andrew Publishing, Oxford, pp. 111–120. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3481-2.00009-0>
- Wang, G.S., Lee, J.-W., Zhu, J.Y., Jeffries, T.W., 2011. Dilute Acid Pretreatment of Corncob for Efficient Sugar Production. *Appl Biochem Biotechnol* 163, 658–668. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9071-4>
- Wang, Q.Q., He, Z., Zhu, Z., Zhang, Y.-H.P., Ni, Y., Luo, X.L., Zhu, J.Y., 2012. Evaluations of cellulose accessibilities of lignocelluloses by solute exclusion and protein adsorption techniques. *Biotechnology and Bioengineering* 109, 381–389. <https://doi.org/10.1002/bit.23330>

- Weijde, T. van der, Alvim Kamei, C.L., Torres, A.F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R.G.F., Trindade, L.M., 2013. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00107>
- Weil, J., Sarikaya, A., Rau, S.-L., Goetz, J., Ladisch, C.M., Brewer, M., Hendrickson, R., Ladisch, M.R., 1997. Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water. *Appl Biochem Biotechnol* 68, 21–40. <https://doi.org/10.1007/BF02785978>
- West, J.J., Smith, S.J., Silva, R.A., Naik, V., Zhang, Y., Adelman, Z., Fry, M.M., Anenberg, S., Horowitz, L.W., Lamarque, J.-F., 2013. Co-benefits of mitigating global greenhouse gas emissions for future air quality and human health. *Nature Climate Change* 3, 885–889. <https://doi.org/10.1038/nclimate2009>
- White, L., Donohue, I., Emmerson, M.C., O'Connor, N.E., 2018. Combined effects of warming and nutrients on marine communities are moderated by predators and vary across functional groups. *Glob. Change Biol.* 24, 5853–5866. <https://doi.org/10.1111/gcb.14456>
- Wiloso, E.I., Heijungs, R., de Snoo, G.R., 2012. LCA of second generation bioethanol: A review and some issues to be resolved for good LCA practice. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 5295–5308. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.035>
- Xiang, Q., Lee, Y.Y., Torget, R.W., 2004. Kinetics of Glucose Decomposition During Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass, in: Finkelstein, M., McMillan, J.D., Davison, B.H., Evans, B. (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, pp. 1127–1138.
- Xing, Y., Bu, L., Zheng, T., Liu, S., Jiang, J., 2016. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis of corncob residues by bisulfite pretreatment for biorefinery. *Bioresource Technology* 221, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.086>
- Xu, F., 2010. Chapter 2 - Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition, in: Sun, R.-C. (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. Elsevier, Amsterdam, pp. 9–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00002-X>
- Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D.A., 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth Res* 119, 101–117. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9874-6>
- Yeh, A.-I., Huang, Y.-C., Chen, S.H., 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydrate Polymers* 79, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.049>
- Yoo, J., Alavi, S., Vadlani, P., Behnke, K.C., 2012. Soybean Hulls Pretreated Using Thermo-Mechanical Extrusion—Hydrolysis Efficiency, Fermentation Inhibitors, and Ethanol Yield. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 576–589. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9449-y>
- Yu, Y., Wu, H., 2011. Effect of ball milling on the hydrolysis of microcrystalline cellulose in hot-compressed water. *AIChE Journal* 57, 793–800. <https://doi.org/10.1002/aic.12288>
- Yusri, I.M., Mamat, R., Najafi, G., Razman, A., Awad, O.I., Azmi, W.H., Ishak, W.F.W., Shaiful, A.I.M., 2017. Alcohol based automotive fuels from first four alcohol family in compression and spark ignition engine: A review on engine performance and exhaust emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 77, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.080>
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J.N., Azirun, M.S., Hashim, R., Nasrulhaq Boyce, A., 2014. Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice [WWW Document]. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/957102>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66, 751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 17–34. <https://doi.org/10.1007/s002530100624>
- Zhang, S., Xu, Y., Hanna, M.A., 2012. Pretreatment of Corn Stover with Twin-Screw Extrusion Followed by Enzymatic Saccharification. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 458–469. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9441-6>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N., 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *Journal of Biotechnology* 139, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.08.009>
- Zhao, J., Chen, H., 2014. Stimulation of Cellulases by Small Phenolic Compounds in Pretreated Stover. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3223–3229. <https://doi.org/10.1021/jf405046m>
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 815. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012a. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6, 465–482. <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2012b. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pretreatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6, 561–579. <https://doi.org/10.1002/bbb.1350>
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D., 2008. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. *Bioresource Technology* 99, 3729–3736. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.016>
- Zheng, J., Choo, K., Rehmann, L., 2015. The effects of screw elements on enzymatic digestibility of corncobs after pretreatment in a twin-screw extruder. *Biomass and Bioenergy* 74, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.01.022>
- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., 2009a. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 2, 51–68. <https://doi.org/10.3965/ijabe.v2i3.168>
- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., 2009b. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 2, 51–68. <https://doi.org/10.25165/ijabe.v2i3.168>
- Zhu, J.Y., Pan, X.J., 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives* 101, 4992–5002. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>
- Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzapfel, M.T., 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology* 99, 3817–3828. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.033>
- Zhuang, J., Wang, X., Xu, J., Wang, Z., Qin, M., 2017. Formation and deposition of pseudo-lignin on liquid-hot-water-treated wood during cooling process. *Wood Science and Technology* 51, 165–174. <https://doi.org/10.1007/s00226-016-0872-7>



# Chapitre II : Optimisation du prétraitement alcalin en extrudeur bi-vis

## Table des matières

2. Optimisation du prétraitement alcalin en extrudeur bi-vis .....	107
2.1 Introduction.....	107
2.2 Caractérisation de la matière première : Coproduit de maïs doux (CMD) .....	109
2.2.1 Obtention du co-produit de maïs doux et sa disponibilité.....	109
2.2.2 Caractérisation du coproduit de conserverie de maïs doux.....	111
2.2.3 Mesure d'hydrolysabilité des coproduits de maïs doux.....	113
2.2.4 Granulométrie du lot de CMD 3 .....	115
2.2.5 Conclusion caractérisation du CMD .....	117
2.3 Etude préliminaire : NaOH, KOH et Ca(OH) <sub>2</sub> .....	117
2.3.1 Mise en place du profil de vis.....	117
2.3.2 Etude de l'impact de la nature de l'alcalin .....	119
2.3.3 Etude de l'influence de la température de la charge en alcalin: cas de NaOH et de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	124
2.3.4 Conclusion .....	131
2.4 Optimisation du prétraitement dans le procédé global de transformation du substrat lignocellulosique en éthanol au stade laboratoire.....	131
2.4.1 Etude du prétraitement avec KOH et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	131
2.4.2 Etude du prétraitement avec NaOH et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	151
2.4.3 Eléments de conclusion sur l'orientation du choix de l'alcalin .....	176
2.5 Passage à l'échelle pilote du prétraitement alcalin .....	179
2.5.1 Mise en place des conditions d'extrusion .....	179
2.5.2 Composition de l'extrudat de CMD prétraité obtenu avec l'extrudeur EV53 .....	182
2.5.3 Hydrolyse enzymatique de l'extrudat de CMD obtenus avec l'extrudeur EV53 .....	184
2.5.4 Conclusion .....	185
2.6 Conclusion du chapitre.....	185
2.7 Références.....	187

## 2. Optimisation du prétraitement alcalin en extrudeur bi-vis

### 2.1 Introduction

Kim et al. (2016) ont montré que l'emploi d'un catalyseur alcalin sur la biomasse lignocellulosique provoque principalement une solubilisation des lignines et des hémicelluloses, par la saponification des liaisons intermoléculaires. Ces modifications engendrent une diminution du degré de polymérisation des composés pariétaux et conduisent à une augmentation de la porosité, améliorant ainsi l'accessibilité de la surface et une diminution de la cristallinité de la biomasse (Kim et al., 2016). Dans la littérature le prétraitement alcalin a été étudié en utilisant plusieurs types d'agents alcalin, de manière prédominante on y retrouve l'hydroxyde de sodium (Chen et al., 2013; Cheng et al., 2010; Choi et al., 2014; Modenbach, 2013). Parmi les autres agents alcalins étudiés, l'hydroxyde de calcium a aussi été employé pour le prétraitement alcalin du résidu de maïs (Kaar and Holtzapfle, 2000; Kim and Holtzapfle, 2006, 2005) et du switchgrass (Xu et al., 2010a). Même s'il a été moins étudié, l'hydroxyde de potassium s'est montré efficace lors de la délignification et l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique (Liu et al., 2015; Paixão et al., 2016; Sharma et al., 2013). La comparaison de l'efficacité du prétraitement réalisé avec ces agents chimiques est rendue difficile, du fait de la grande diversité des conditions opératoires utilisées lors des prétraitements.

Le choix du catalyseur doit être soumis à des compromis en matière d'efficacité, de coût et d'impacts environnementaux. En termes d'efficacité du prétraitement, selon des études comparatives, la soude et la potasse apportent des meilleurs résultats que la chaux pour la délignification et l'amélioration de l'accessibilité enzymatique (Dong Yang et al., 2009; Rodrigues et al., 2016). L'étude des performances entre NaOH et KOH, est moins claire dans la littérature. Dans une étude préliminaire réalisée par Paixao et al. (2016), la potasse montre un taux de délignification et un enrichissement en cellulose sur la bagasse de canne à sucre plus élevé que la soude (Paixão et al., 2016). Tandis que Dong Yang et al. (2009), ont obtenu une meilleure délignification et biodégradabilité de la paille de riz en employant du NaOH comparé à KOH (Dong Yang et al., 2009). En ce qui concerne le coût, la potasse possède le prix le plus élevé et le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  le plus faible (**Tableau 2.1**). En termes environnementaux, les effluents issus du traitement à la soude comme l'hydroxyde de calcium sont reliés à des problématiques de salinisation et contamination des sols, qui peuvent être surmontées en utilisant la potasse puisque le potassium peut être exploité comme nutriment pour les plantes (Dong Yang et al., 2009). Même si, son efficacité est moindre, il reste à remarquer qu'en termes de sécurité de manipulation l'hydroxyde de calcium représente moins de danger que la soude et la potasse qui sont plus agressives, mais aussi

qu'il est possible de récupérer le calcium de sa forme  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  par précipitation avec du  $\text{CO}_2$  (Rodrigues et al., 2016).

**Tableau 2.1** Comparaison entre soude, potasse et chaux (Rodrigues et al., 2016)

	Hydroxyde de sodium	Hydroxyde de potassium	Hydroxyde de calcium
Formule Moléculaire	NaOH	KOH	$\text{Ca}(\text{OH})_2$
Masse molaire (g/mol)	39,998	56,106	74,092
% OH de la masse	42,5	30,4	45,9
Coût (euros/t)	446	968	338.8

Toutefois, les performances du prétraitement alcalin selon le choix du catalyseur sont dépendantes des conditions opératoires. Les variables opératoires les plus étudiées sont la concentration en agent alcalin, la température et la durée de prétraitement. Ainsi par exemple, les auteurs Xu et al. (2010a,b) et Sharma et al. (2013), ont réalisé les prétraitements alcalins sur du switchgrass en utilisant la chaux, la soude et la potasse respectivement. Du fait du caractère peu insoluble de la chaux à faible température, la concentration de chaux lors des essais n'a été testée qu'à 0.1g par g de matière sèche. En ce qui concerne NaOH et KOH, l'impact de la concentration en alcalin a été étudié entre 0.5 et 2.0 % (g de alcalin/ 100 g de matière sèche). Pour les trois agents alcalins, les paramètres modifiés en plus de la concentration ont été la température (21°C, 50°C et 120°C) et les temps de réaction (Sharma et al., 2013; Xu et al., 2010a, 2010b). Les conclusions de ces études ont montré que les variables principales sont la concentration en alcalin et la température, à exception pour la chaux où les temps de réaction longs sont préconisés. Les meilleurs rendements pour ces trois études sont obtenus avec KOH (582.4mg sucres/g de biomasse contre 453mg/g pour NaOH et 433mg/g pour la chaux). Ces études, ne prennent pas en compte la molarité en ions  $\text{OH}^-$  ; c'est la raison pour laquelle Rodrigues et al. (2016) ont fait une comparaison de l'effet de ces catalyseurs sur du switchgrass et du miscanthus, en se basant sur le taux de  $\text{OH}^-$  équivalent à des températures de 20°C et 50°C. Les résultats de cette étude ont montré une efficacité supérieure de NaOH et KOH par rapport au  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Cependant NaOH reste économiquement plus intéressant avec un coût de production compris entre 0.11 et 0.19 \$/Kg pour le glucose, tandis que pour KOH le coût de production varie de 0.45 à 0.70 \$/Kg pour le glucose (Rodrigues et al., 2016).

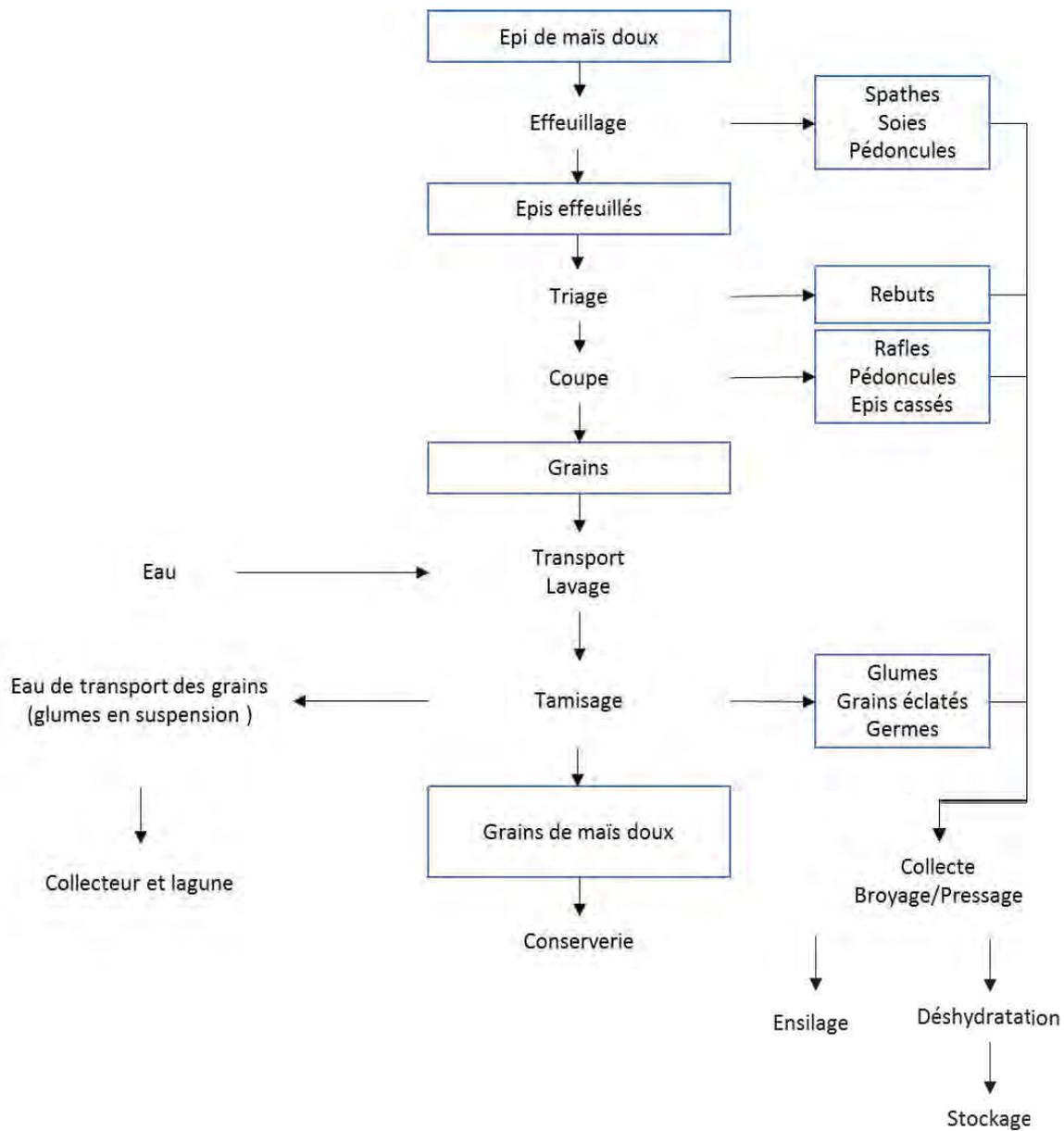
Les études mentionnées ci-dessus sont cependant réalisées dans des réacteurs de type autoclave ou dans des erlenmeyers sous agitation. Les études comparatives traitant de l'utilisation de ces agents en extrusion réactive comme prétraitement de la biomasse lignocellulosique sont limitées. De par son efficacité élevée et son coût, la plupart des études menées en extrusion bi-vis ont été réalisées avec de la soude (Duque et al., 2014; Liu et al., 2018; Vandebossche et al., 2014a, 2016).

Un des objectifs de cette thèse est l'optimisation du procédé de prétraitement alcalin en extrusion bi-vis. Economiquement et en termes d'impact environnemental, un des buts visés est d'atteindre des rendements en sucres fermentescibles élevés par hydrolyse enzymatique, tout en diminuant la quantité de produits chimiques utilisés et en valorisant au mieux les effluents. Dans ce chapitre, différentes stratégies ont été étudiées : d'un côté par l'utilisation de différents types de bases qui ont potentiellement une efficacité équivalente à celle du NaOH, et d'autre part par la modification des conditions du prétraitement par extrusion. Notamment l'étude de l'influence de la concentration en alcalin et la température. Le passage à l'échelle pilote est abordé en fin de ce chapitre. Toutes les études présentées ont été réalisées sur le coproduit de maïs doux.

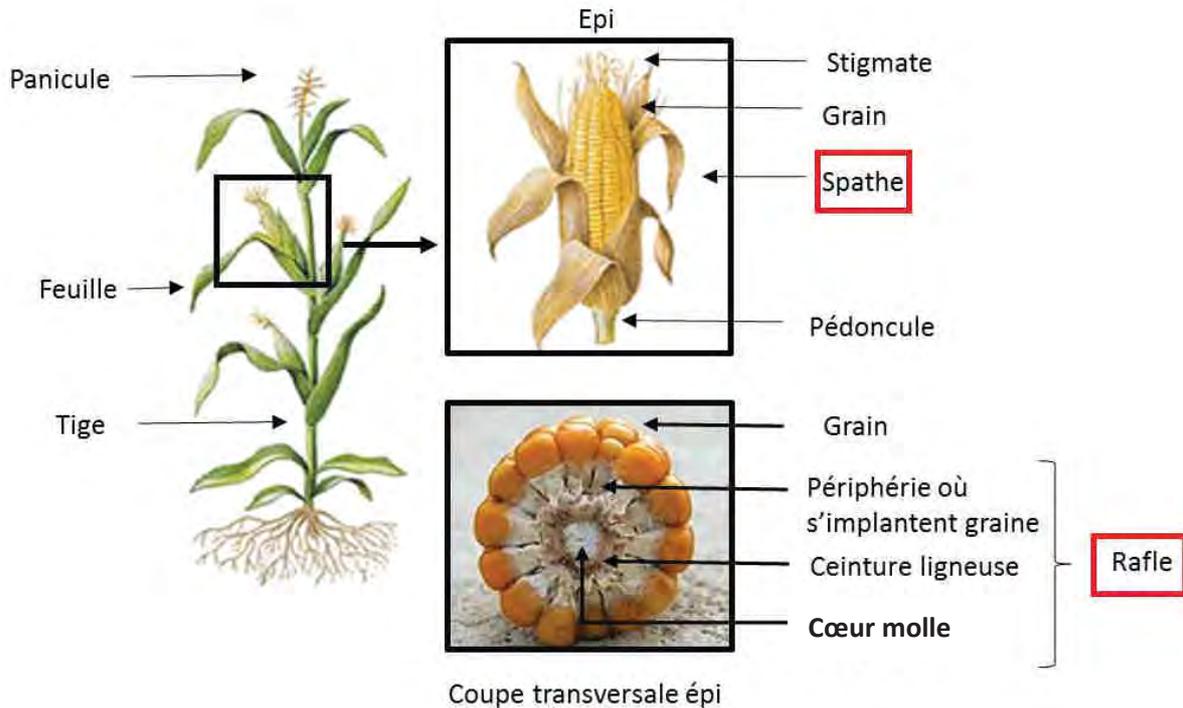
## **2.2 Caractérisation de la matière première : Coproduit de maïs doux (CMD)**

### **2.2.1 Obtention du co-produit de maïs doux et sa disponibilité**

Le maïs doux (*Zea mays*) est une variété du maïs qui se caractérise par une teneur sucres plus élevée que celle du maïs traditionnel ; généralement les grains de maïs doux contiennent plus de 25% de sucres solubles. Le maïs doux est récolté une fois par an, entre juillet et octobre, sa récolte se fait lorsque les grains sont à un stade immature et les feuilles sont vertes (Singh et al., 2014). Le maïs doux est consommé comme un légume plutôt que comme une graine, sous forme de conserve ou surgelé. Dans l'industrie de la conserverie, les épis sont effeuillés puis les grains sont coupés de la rafle, lavés et tamisés pour être mis en conserve (Makoumbou, 1988)(**Figure 2.1**). Les coproduits de conserverie de maïs doux sont composés principalement de la rafle, découpée à la base du grain ; et des spathes (**Figure 2.1**).



**Figure 2.1** Schéma du procédé de traitement des épis de maïs doux dans l'industrie de conserverie (Mokoumbou, 1988)



**Figure 2.2** Représentation de plante de maïs (*Zea Mays*) et coupe transversale de l'épi, en rouge encadrés les principaux constituants des coproduits de conserverie de maïs doux, figure adaptée des archives Larousse

Dans le cadre du projet BABET-REAL 5, la coopérative OVALIE a réalisé une étude sur la disponibilité et le coût des résidus produits dans les régions de Nouvelle Aquitaine et d'Occitanie. Cette étude tient compte des problématiques techniques, des limites sociales, des restrictions par la réglementation et des utilisations compétitives. Sa production a été estimée à 30 000 tonnes sec par an dans le Sud-Ouest de la France. Actuellement, les coproduits sont souvent valorisés dans l'alimentation animale, sous forme deshydratée comme aliment pour le bétail, mais cette biomasse est considérée comme 100% disponible et prêt à l'emploi.

### 2.2.2 Caractérisation du coproduit de conserverie de maïs doux

Les coproduits de conserverie de maïs doux ont été approvisionnés par la SARL Soupro + (Castelmoron sur Lot, Nouvelle Aquitaine, France). Les études présentées dans cette thèse ont été menées en utilisant différents lots de matière première, fournis à différents moments, correspondant à des campagnes de production (**Tableau 2.2**). Le coproduit de conserverie de maïs doux présente une matière sèche de 10% en sortie d'usine. Pour des raisons de conservation celui-ci a été séché avant son approvisionnement au laboratoire. La technique de séchage du fournisseur a changé durant la période du projet entre la fourniture du lot 2 et celle du lot 3. Le premier a été séché en déshydrateur thermique et l'autre au soleil après étalement au sol. De ce fait, ils présentent des variations de

composition et de réactivité. Le lot 3 a suivi un séchage moins intense, et sa composition se rapproche de celle du coproduit en sortie de conserverie.

**Tableau 2.2** Caractéristiques des différents lots utilisés pour cette études, étude de composition par la méthode de Van Soest and Wine,1967

	<b>Lot 1</b>	<b>Lot 2</b>	<b>Lot 3</b>
			
Année obtention	2013	2016	2017
Matière sèche (%)	92,3 (± 0,0%)	89,8 (± 0,3%)	89,5 (± 0,1%)
Matière minérale (%MS)	4,5 (± 1%)	5 (± 1%)	5 (± 1%)
Fibre insoluble (%MS)	77, 2 ± 0%	77 ± 3%	76 ± 1%
<b>Cellulose (% FI)</b> (%MS)	<b>43,5 ± 0%</b> <b>(33,6%)</b>	<b>47 ± 3%</b> <b>(32,6%)</b>	<b>42 ± 1%</b> <b>(28,6)</b>
<b>Hémicelluloses (%FI)</b> (%MS)	<b>50,1 ± 1%</b> <b>(38,7)</b>	<b>46 ± 4%</b> <b>(31,9)</b>	<b>54 ± 1%</b> <b>(36,7)</b>
<b>Lignines (% FI)</b> (%MS)	<b>6,3± 1%</b> <b>(4,9)</b>	<b>7 ± 2%</b> <b>(4,9)</b>	<b>4 ± 1%</b> <b>(2,7)</b>
MS: Matière Sèche FI: Fraction insoluble			

Le lot 1 a été employé dans ce chapitre lors de l'essai à l'échelle pilote sur EV53 (site de Tarbes) et à échelle laboratoire à Toulouse tandis que les lots 2 et 3 ont été utilisés uniquement à l'échelle laboratoire à Toulouse. En termes de composition, les lots sont différents. La partie lignocellulosique ou fibre insoluble (FI) forme environ 77% de la matière sèche. Elle est composée de cellulose (42-47%), d'hémicelluloses (46-54%) et d'une faible teneur en lignine inférieure à 5%. Des différences sont observées entre les lots, notamment le lot 2 qui possède une teneur en hémicelluloses plus faible que

les autres lots, et une teneur en cellulose plus élevée. Ces valeurs sont confirmées par l'étude de composition des deux lots par la méthode NREL, en termes d'hémicelluloses le lot 3 possède plus de xylanes et de substitutions en arabinose que le lot 2, ce qui est potentiellement dû à la méthode de séchage du fournisseur (**Tableau 2.3**). Il est à remarquer que la différence sur la quantité de lignines mesurée par la méthode de ADF-NDF et NREL sont différentes, notamment l'utilisation des différents solvants ne permet pas la comparaison.

**Tableau 2.3** Caractérisation des lots 2 et 3 par la méthode NREL de détermination des polysaccharides et lignine dans la biomasse (Sluiter et al. 2012)

		Cendres	Extractibles	Cellulose	Hémicelluloses		Acétyl Lignines				Total	
					Xylane	Arabinane	AIL	ASL				
					% Matière sèche							
Lot 2	Moyenne	6,0	17,4	30,7	25,6	23,0	2,6	5,6	17,81	18,9	0,7	99
	ET	2,4	1,2	0,6	0,8	0,8	0,1	1,0	0,8	3,2	0,1	
Lot 3	Moyenne	8,6	13,1	31,0	29,6	25,2	4,4	5,9	14,6	14,2	1,4	100
	ET	3,3	1,0	0,2	0,5	0,1	0,6	0,5	0,6	1,1	0,4	

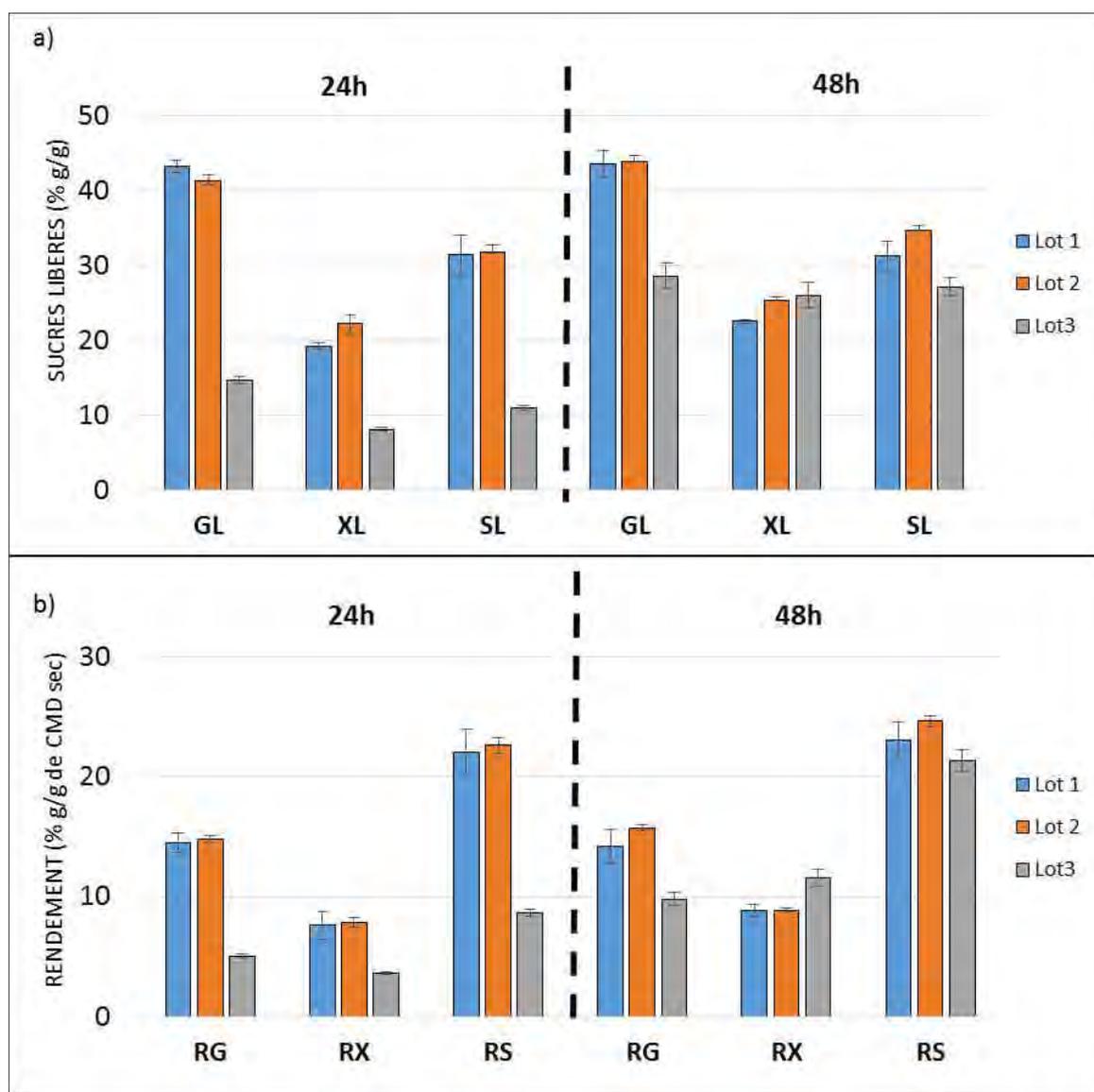
**Note :** AIL : Lignine Acido Insoluble ; ASL : Lignine Acido Soluble

### 2.2.3 Mesure d'hydrolysabilité des coproduits de maïs doux

L'hydrolysabilité est définie comme le rendement d'hydrolyse d'une matière en milieu dilué (5%) de 15 FPU/g de SCC sec de l'accessibilité des enzymes dans le coproduit de maïs doux. Ainsi les résultats d'hydrolysabilité sont regroupés dans le **Tableau 2.4** et les représentations graphiques sur la **Figure 2.3**.

**Tableau 2.4** Hydrolysabilité des lots de CMD employés

Lot	Temps d'hydrolyse h	Taux de sucres libérés						Rendement					
		GL	ET	XL	ET	SL	ET	RG	ET	RX	ET	RS	ET
		% (g glc libéré /g de C dans CMD)		% (g xyl libéré/g de H dans CMD)		% (g glc et xyl libérés/g de C et H dans CMD)		% (g glc libéré /g de CMD sec)		% (g xyl libéré /g de CMD sec)		% (g glc et xyl libérés /g de CMD sec)	
Lot 1	24	43,3	0,8	19,3	0,3	31,4	2,6	14,5	0,8	7,6	1,2	22,1	1,9
	48	43,6	1,8	22,6	0,3	31,3	2,0	14,2	1,4	8,9	0,5	23,1	1,5
Lot 2	24	41,3	0,8	22,3	1,2	31,9	1,0	14,8	0,3	7,8	0,4	22,6	0,7
	48	43,9	0,8	25,3	0,5	34,7	0,6	15,7	0,3	8,9	0,2	24,6	0,5
Lot 3	24	14,8	0,5	8,1	0,2	11,0	0,3	5,0	0,2	3,6	0,1	8,6	0,3
	48	28,7	1,7	26,1	1,6	27,2	1,2	9,8	0,6	11,6	0,7	21,4	0,9



**Figure 2.3** Hydrolysabilité des lots de SCC : lot 1 (bleu), le lot 2 (rouge) et le lot 3 (gris), les résultats sont exprimés en taux de sucres libérés (a) et en rendement (b) à 24h et 48h ; GL : Glucose Libéré ; XL : Xylose Libéré ; SL RG : Rendement du Glucose ; RX : Rendement du Xylose ; RS : Rendement en Sucres

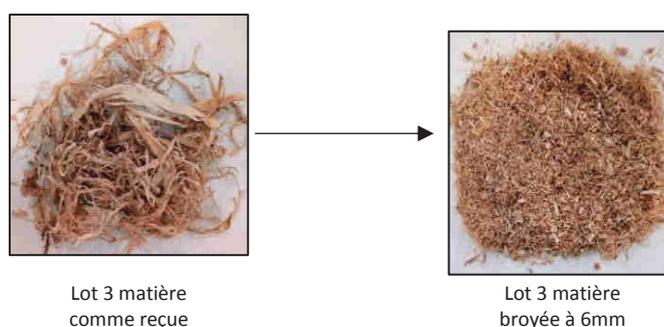
Les mesures d'hydrolysabilité des coproduit de maïs doux sec, broyé à 6mm et sans prétraitement ont permis de mettre en évidence des différences entre les lots de matière utilisés. D'une part, lors des hydrolyses enzymatiques le blanc sans enzymes montre la présence de sucres libres dans la matière. Ainsi, pour le lot 1 il a été détecté la présence de glucose et fructose et pour les lots 2 et 3, la présence de glucose et xylose. D'autre part, la cinétique d'hydrolyse et les rendements ont varié selon les lots de matière. En effet, les taux de sucres libérés du lot 1 et du lot 2 à 24h atteignent des rendements d'environ 40%, 20% et 30% pour le glucose, le xylose et la somme des deux respectivement tandis que pour le lot 3, les taux de sucres libérés sont plus faibles, 15%, 8% et 11% respectivement. A 48h

d'hydrolyse enzymatique, peu de variations sont observées pour les rendements des lots 1 et 2, tandis que ceux du lot 3 ont augmenté par rapport aux sucres potentiels à 29%, 26% et 27% pour RG, RX et RS respectivement.

L'hydrolysabilité des 3 lots employés pour cette thèse, montre des variabilités. Les lots 1 et 2 montrent une plus grande facilité à être hydrolysés par voie enzymatique que le lot 3, avec une cinétique plus rapide dans le cas du glucose puis que la valeur maximale de glucose produite est obtenue des 24h. La variabilité en termes d'hydrolyse enzymatique est difficilement corrélable avec la composition des lots. Toutefois il est à noter que le lot 3 qui présente la plus faible hydrolysabilité est le lot qui comporte le plus d'hémicelluloses et qui présente la couleur la plus claire. Le séchage de la biomasse provoque des modifications physiques qui vont dépendre du type de séchage, de la température et du temps de séchage. Le séchage peut provoquer des réactions biochimiques telles que la réaction de Maillard entre les sucres et les acides aminés, provoquant le brunissement observé selon les lots (**Tableau 2.3**). Le lot 2, qui présente la couleur la plus foncée a probablement subit le séchage le plus intense conduisant ainsi à une dégradation plus importante des sucres. Ceci pourrait expliquer la teneur plus faible en hémicelluloses. Cette dégradation de la structure lignocellulosique pourrait être à l'origine de l'hydrolysabilité supérieure observée. Parallèlement, d'après Bennazzi et Bimbenet le séchage peut provoquer des fissures de la matière, celles-ci pourraient améliorer l'accessibilité des enzymes à leur substrat (Bonazzi and Bimbenet, 2008).

#### 2.2.4 Granulométrie du lot de CMD 3

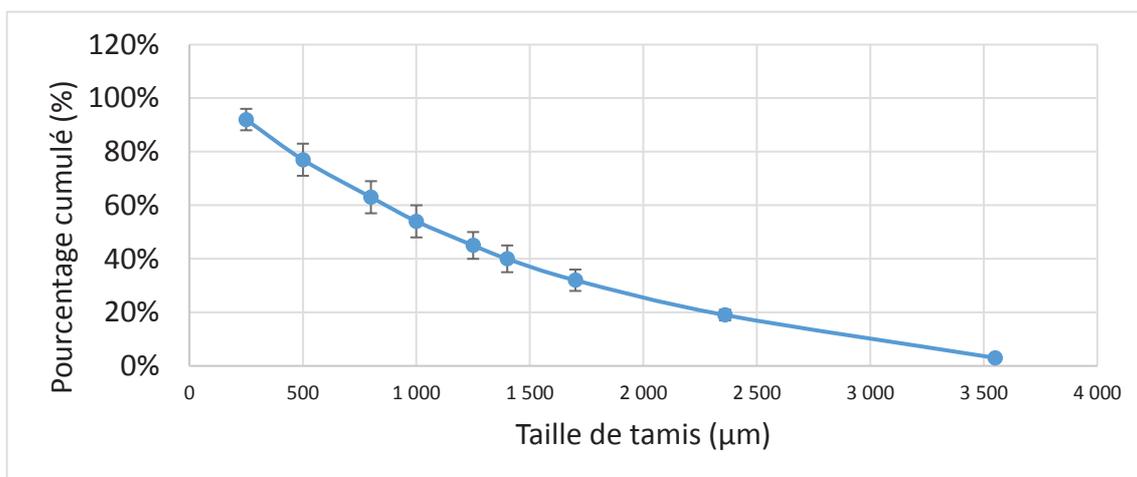
Le lot de matière 3, est celui dont la méthode séchage a été la plus douce et le lot avec lequel la plupart des expériences du chapitre 3 et 4 ont été menées. La matière a été broyée à 6mm et stocké à température ambiante (**Figure 2.4**). Malgré la réduction des particules, la matière reste hétérogène en termes de granulométrie (**Tableau 2.5** et **Figure 2.5**). Le tamisage de la matière permet ainsi de différencier des particules fines qui vont avoir se retrouver lors du tamisage en dessous de 1700 $\mu$ m et des fractions de grains de plus grande taille. Ces fractions grains dur constituent plus de 19% du coproduit de maïs doux broyé.



**Figure 2.4** Photos du lot de matière 3 avant et après broyage avec grille de 6mm

**Tableau 2.5** Résultats du tamisage du lot 3

Tamis	Composition	Pourcentage cumulé (%)	Description
$\mu\text{m}$	Moyenne (%)	Moyenne	
3 550	3 ( $\pm 1$ )	3 ( $\pm 1$ )	Grain dur
2 360	16 ( $\pm 2$ )	19 ( $\pm 2$ )	Grain dur
1 700	13 ( $\pm 2$ )	34 ( $\pm 4$ )	Grain dur avec fibre et fines particules
1 400	8 ( $\pm 1$ )	40 ( $\pm 5$ )	Grain dur avec fibre et fines particules
1 250	5 ( $\pm 1$ )	45 ( $\pm 5$ )	
1 000	9 ( $\pm 1$ )	54 ( $\pm 6$ )	
800	9 ( $\pm 0$ )	63 ( $\pm 6$ )	Fibres fines
500	14 ( $\pm 1$ )	77 ( $\pm 6$ )	Fibres fines
250	15 ( $\pm 1$ )	92 ( $\pm 4$ )	Fibres fines
-	9 ( $\pm 4$ )	101 ( $\pm 0$ )	Fibres fines et poussières


**Figure 2.5** Pourcentage cumulé en fonction de la taille du tamis

Une analyse de la composition de ces grains durs a été réalisée (**Tableau 2.6**). Les grains ont été broyés afin d'être analysés, en vue de la forte récalcitrance qu'ils présentent aux réactifs utilisés pour l'analyse. Les grains durs obtenus possèdent une partie lignocellulosique élevée composée principalement d'hémicelluloses et cellulose, peu de lignine a été retrouvée. Une hypothèse sur la provenance de cette fraction appelée « grain dur » est que qu'elle correspond à la ceinture ligneuse de la rafle.

**Tableau 2.6** Composition des grains « durs » broyés

	MS	MM	Azote	Prot	FI	C	H	L
Unité		%MS	%MS	%MS	%MS	%FI	%FI	%FI
Moyenne (EC)	93% (± 0,1%)	2,5% (± 0,1%)	0,6% (±0%)	3,9% (0,2%)	86,3%	46,3%	47,8%	5,9%

Note : MS : Matière Sèche ; MM : Matière minérale ; Prot : Protéines, FI : Fibres Insolubles ; C : Cellulose ; H : Hémicelluloses ; L : Lignine

### 2.2.5 Conclusion caractérisation du CMD

Le coproduit de maïs doux, une matière abondante et disponible dans le Sud-Ouest de la France, a permis de mettre évidence la variabilité de sa composition, de son potentiel d'hydrolysabilité et morphologique. A partir des résultats de composition des 3 lots, des différences notamment en fraction hémicellulosique ont été repérées : le lot 3 étant plus riche en hémicelluloses par rapport au lot 2. De même, des différences sont observées lors de l'hydrolyse des différents lots de CMD : une hydrolysabilité faible du lot de CMD 3 par rapport aux lots 1 et 2. Finalement, l'analyse de granulométrie du lot de CMD 3 montre la variabilité de la taille et forme des particules qui composent la matière brute employée lors des études.

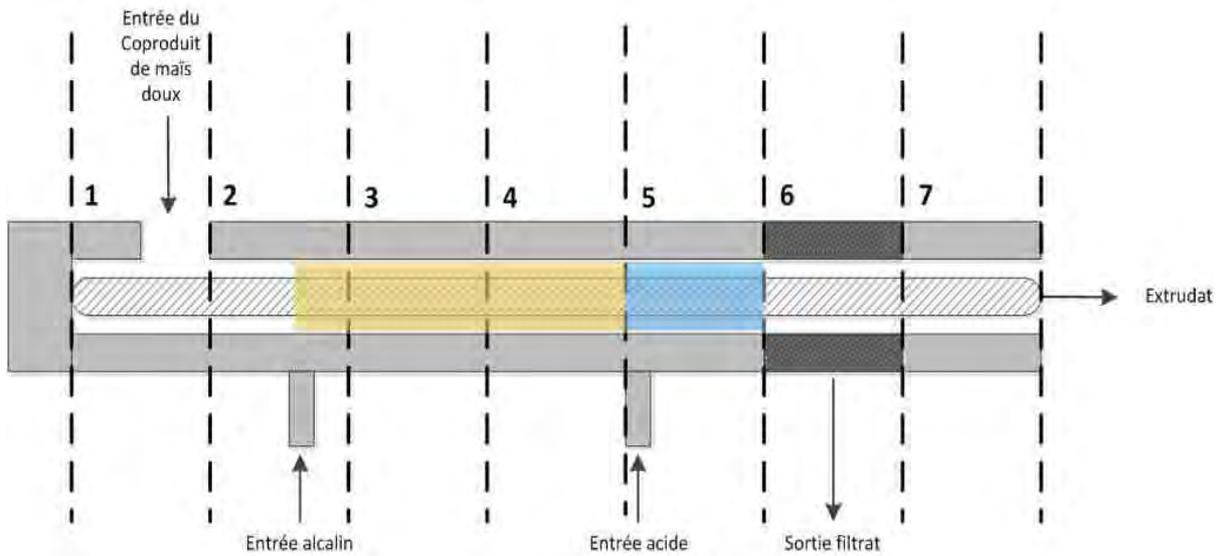
## 2.3 Etude préliminaire : NaOH, KOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

### 2.3.1 Mise en place du profil de vis

Une étude préliminaire sur la mise en place du prétraitement alcalin en employant différents types d'alcalin et en étudiant l'effet de la température sur l'efficacité de celui-ci a été menée. L'extrudeur employé est de type BC21 (Clextral, France), il est composé de 7 modules chauffants, et permettant de travailler à un débit en entrée solide compris de 1 et 10Kg/h. L'entrée de la matière première se fait par le module 1 qui possède une ouverture sur la partie supérieure. Les entrées de liquides sont positionnées au niveau du module 3 pour celle de la base et en module 4 pour celle de l'acide. Au niveau du module 6, un filtre a été placé de diamètre 1.8mm en sortie a été placé. Il est formé de 6 demi-coquilles percées de pores de 1mm à l'entrée. La **Figure 2.6** montre une représentation schématique de la configuration employée pour cette étude.

Le profil utilisé a été adapté du profil mis en place durant le projet BABETHANOL. Au niveau de l'entrée du solide, des vis de type trapézoïdales et conjuguées permettent le convoyage de la matière dans l'extrudeur (**Tableau 2.7**). Dans le module 3, des vis de type bilobe ont été placées pour faciliter l'imprégnation du réactif dans le substrat. Un contrefilet (CF2C) est placé dans le module 4 dans le but

de créer une accumulation de matière et d'éviter une remonté de l'acide vers le module 3. Le module de filtration est situé au niveau du module 6, cette filtration est assurée en partie par la présence d'un contrefilet placé en début de module 7. Lorsque la matière avance en fin de module 6, elle subit une compression du fait de la présence du contrefilet placé en début de module 7. Un «bouchon dynamique», se crée, ce qui conduit au pressage de la matière. La partie liquide (filtrat) s'écoule par le filtre au niveau du module 6, et la matière solide prétraitée (extrudat) traverse progressivement le contrefilet pour s'évacuer en bout du fourreau d'extrudeur.



**Figure 2.6** Schéma représentatif de la configuration de l'extrudeur BC21 employée lors de cette étude avec un zone de prétraitement alcalin (jaune), une zone de neutralisation (bleu) et de filtration

Module	1		2		3		4		5		6		7		
Température module consigne	50		100		Variable		Variable		100		50		50		
Type de vis	T2F	T2F	C2F	C2F	BB	C2F	C2F	CF2C	C2F	BB	C2F	C2F	C2F	CF2C	C2F
Longueur de vis ou nombre d'éléments restrictifs	50	50	50	50	10X10	50	50	25	50	5X5	50	50	50	25	50
Pas de vis ou angle entre les éléments restrictifs de vis	66	66	33	25	90	33	25	-16	33	90	33	25	16	-25	33

**Tableau 2.7** Profil de vis employé pour l'étude préliminaire avec BC21

Comme montré précédemment la matière première présente un caractère hétérogène en termes de granulométrie et forme de particules, ce qui est un défi pour le contrôle du débit de la matière en entrée d'extrudeur. Le lot employé dans cette partie est le lot 2, broyé au préalable avec une grille de 6mm. Pour les essais présentés dans cette partie, le débit de solide a été fixé à partir d'un étalonnage, cependant des variations du débit solide ont été observées ; c'est la raison pour laquelle les ratios base/Kg de matière sèche de coproduit de maïs doux ne sont pas exactement les mêmes pour tous les essais. Le débit solide, la vitesse de vis ainsi que les ratios liquides/solides pour les zones de prétraitement alcalin et neutralisation ont été fixés selon le **Tableau 2.8**.

**Tableau 2.8** Paramètres et valeurs fixés pour l'étude préliminaire

Paramètre	Débit entrée (Kg/h)	Vitesse de vis (rpm)	Ratio L/S base (Kg/Kg)	Ratio L/S acide (Kg/Kg)
Valeurs fixées	2,8	220	1,2-1,3	4

### 2.3.2 Etude de l'impact de la nature de l'alcalin

Des essais ont été réalisés afin d'étudier l'impact changement de nature de l'agent l'alcalin sur le prétraitement (**Tableau 2.9**). La charge en catalyseur est donnée en moles d'OH<sup>-</sup> par kg de CMD sec. Pour faciliter la lecture les valeurs sont exprimées en pourcentage de OH<sup>-</sup>/CMD sec. Lors des premiers essais, Ca(OH)<sub>2</sub> n'étaient pas totalement soluble aux concentrations désirées provoquant le colmatage des pompes. Un essai a de ce fait été mené en introduisant de façon régulière le Ca(OH)<sub>2</sub> solide au niveau de l'entrée solide conjointement au coproduit de maïs doux. Lors de cet essai, seule de l'eau a été introduite au niveau de la première entrée liquide. Les essais comparatifs entre les trois agents alcalins ont été réalisés à une température de consigne du fourreau de 150°C et un ratio en OH<sup>-</sup>/CMD sec proche 1,6 mol/Kg. Un essai comparatif supplémentaire entre NaOH et KOH a été réalisé à 130°C dans le but d'étudier l'influence de la température pour un ratio OH<sup>-</sup>/CMD sec de 1,3 mol/Kg.

**Tableau 2.9** Conditions opératoires employés pour étudier l'impact de NaOH, KOH et Ca(OH)<sub>2</sub> sur l'efficacité du prétraitement

Essai		1	2	3	4	5
Ss	tr/min	220	220	220	220	220
Q <sub>s</sub>	kg/h	2,1	3,1	2,2	2,1	0,6
<b>Base</b>		<b>NaOH</b>	<b>NaOH</b>	<b>KOH</b>	<b>KOH</b>	<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>
Q <sub>base</sub>	kg/h	3	3	3,2	2,8	2,8 (eau)
[base]	%	6	6	5,6	5,6	
<b>T consigne prétraitement</b>	<b>°C</b>	<b>130</b>	<b>150</b>	<b>130</b>	<b>150</b>	<b>150</b>
<b>OH-/CMD sec</b>	<b>mol/Kg</b>	<b>1,3</b>	<b>1,6</b>	<b>1,3</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>
Base /CMD sec	%	5,3	5,5	7,4	7,4	5,9
Q <sub>acide</sub>	Kg/h	9,5	10,4	10,4	9,8	9,8
[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	%	1,14	1,14	1,5	1,5	2,25
Q <sub>ext</sub>	Kg/h	6,6	6,2	3,4	3,2	11,3
MS <sub>ext</sub>	%	33,6	32,5	44,2	42,1	48,9
pH ext		7	7	7	7	7
Q <sub>fil</sub>	Kg/h	9,5	9,9	11	11,1	11,2
MS <sub>fil</sub>	%	9,46	9,42	6,3	6,3	5,2
MM <sub>fil</sub>	%MS	30,0	26,0	31,9	35,3	22,6
L/Sb	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	0,9	0,9	1,3	1,6	1,7
L/Sa	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	3,4	3,9	5,0	6,3	6,3
Base/acide	mol/mol	4,0	3,7	2,0	1,9	1,2

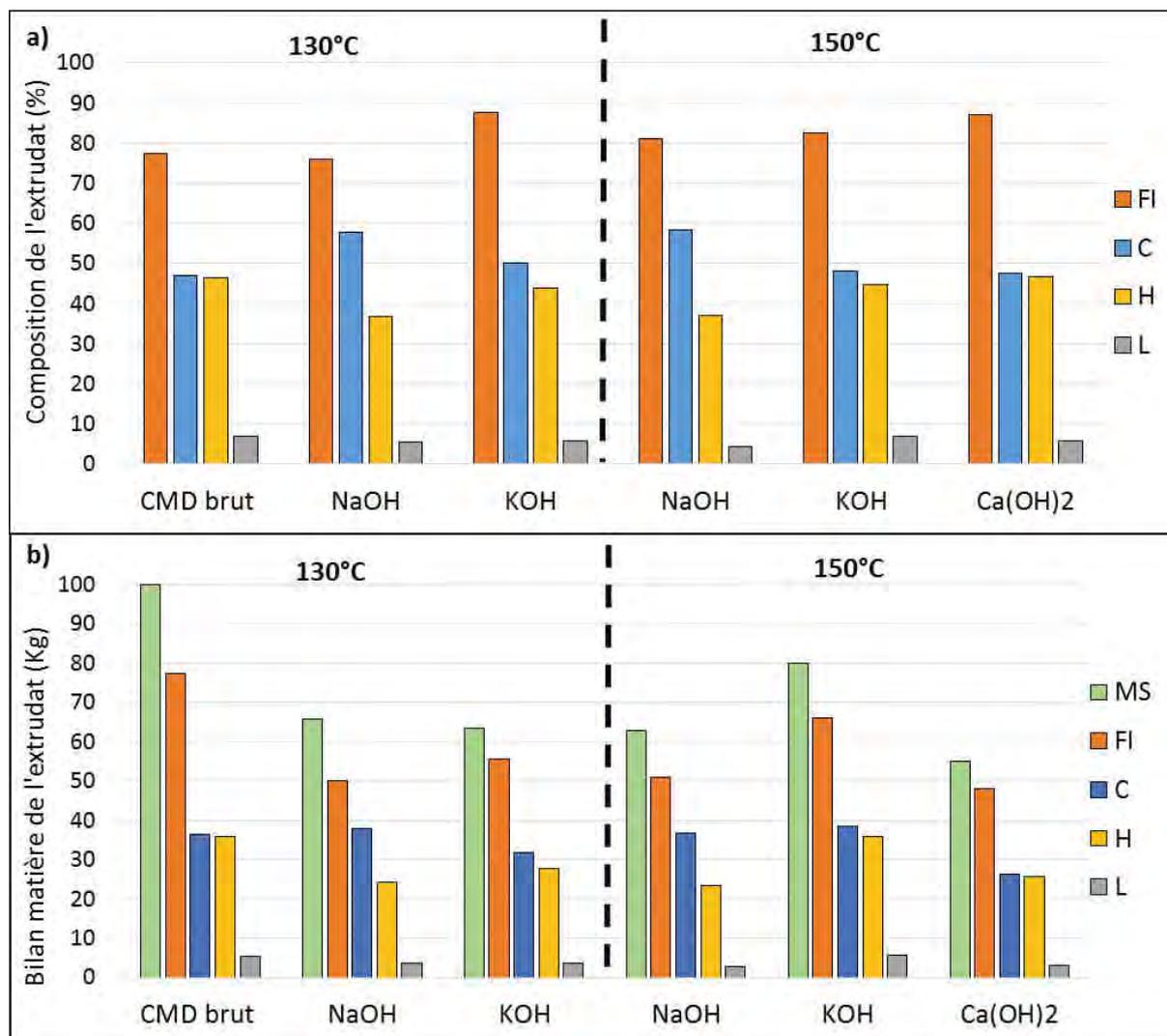
Ss : Vitesse de vis ; Q<sub>s</sub> : Débit solide entrée ; CMD : Coproduit de maïs Doux ; Q<sub>base</sub> et Q<sub>acide</sub>: débit solution alcaline et de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> respectivement ; [base] et [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]: concentrations respectives des solutions alcaline et d'acide; L/Sb et L/Sa : Ratio liquide/solide respectifs pour l'introduction de l'alcalin et acide; T : température consigne du fourreau; Q<sub>filtrat</sub> et Q<sub>extrudat</sub> : débits respectifs de sortie du filtrat et de l'extrudat ; MS :Matière Sèche

L'efficacité des prétraitements est évaluée sur la composition de la matière prétraitée obtenue, par les rendements calculés lors de l'analyse des bilans matière et par les taux de conversion en monomères à partir de la cellulose et des hémicelluloses obtenus après hydrolyse enzymatique. A partir de ces données, le bilan matière pour 100 Kg de matière sèche a été calculé, ce qui a permis d'obtenir le rendement en cellulose conservée et les taux de lignines et hémicelluloses extraites. L'hydrolyse enzymatique des extrudats a été réalisée dans les conditions d'hydrolysabilité, ainsi les performances du prétraitement ont uniquement été évaluées par le taux de monomères libérés par rapport aux monomères potentiels dans la matière prétraitée.

**Tableau 2.10** Composition des extrudats et bilans matière obtenus pour 100Kg de CMD sec introduit pour un prétraitement mené à 130°C et 150°C avec différents agents alcalins à concentration en OH-équivalente

Essai	Base	OH/CMD sec	T °C	Composition extrudat					Bilan matière pour 100Kg de matière sèche de CMD				
				MS	FI	C	H	L	MS	FI	C	H	L
				%	%MS	% FI	%FI	%FI	Kg	Kg	Kg	Kg	Kg
CMD lot 2				89,8	77,3	47	46,3	7,0	100	77,3	36,3	35,8	5,4
1	NaOH	1,3	130	33,6	76,0	57,8	36,7	5,5	66	50,0	38,0	24,1	3,6
2	NaOH	1,4	150	32,5	81,2	58,4	37,1	4,5	63	51,1	36,7	23,3	2,8
3	KOH	1,3	130	44,2	87,6	50,2	43,8	5,9	63	55,6	31,9	27,8	3,7
4	KOH	1,7	150	42,1	82,6	48	44,8	7,0	80	66,0	38,4	35,8	5,6
5	Ca(OH) <sub>2</sub>	1,6	150	48,9	87,0	47,46	46,8	5,7	55	48	26	26	3

La composition des extrudats et le bilan matière obtenus pour 100 Kg de matière sèche entrante sont regroupés dans le **Tableau 2.10** et **Figure 2.7**. De manière générale, une diminution de la matière sèche contenue dans l'extrudat est observée indiquant qu'il y a eu une solubilisation de certains composés du CMD brut. La matière solide obtenue avec la chaux est la plus faible par rapport à celle avec NaOH et KOH. Cette perte de matière solide est liée à une perte de matière lors de la filtration. La composition des extrudats obtenus avec de la soude à 130°C et à 150°C est très proche, et leur partie lignocellulosique est composée majoritairement de cellulose. La soude conduit à une extraction plus importante des lignines et des hémicelluloses que KOH et Ca(OH)<sub>2</sub>. L'effet de la température est peu significatif pour KOH. Le prétraitement mené avec de la soude permet d'obtenir l'extrudat le plus riche en celluloses, et pour lequel le maximum d'hémicelluloses et de lignines ont été extraites.



**Figure 2.7** Composition des extrudats exprimés en % de matière sèche (MS)(a) en fibre Insoluble (FI) , Cellulose (C), Hémicelluloses (H) et Lignines (L) et bilans matière obtenus pour 100Kg de CMD sec introduit (b) pour un prétraitement mené à 130°C et 150°C avec différents agents alcalins à une concentration en OH<sup>-</sup> de 1,55-1,7 mol/Kg de CMD sec

Le faible impact du prétraitement obtenu avec la chaux peut être dû à une faible solubilisation de celle-ci dans les conditions mises en œuvre dans l'extrudeur. Des temps de mise en contact plus longs seraient certainement nécessaires afin de permettre une bonne solubilisation et pénétration du réactif. Malheureusement dans le cas de l'extrusion bi-vis, les temps de séjour sont très courts (environ quelques minutes). D'autre part, des études portant sur l'utilisation de la chaux ont montré l'existence des liaisons entre les ions Ca<sup>2+</sup> et les lignines, négativement chargées en conditions alcalines, qui protégeraient les lignines de l'attaque par les ions OH<sup>-</sup> (Xu et al., 2010a).

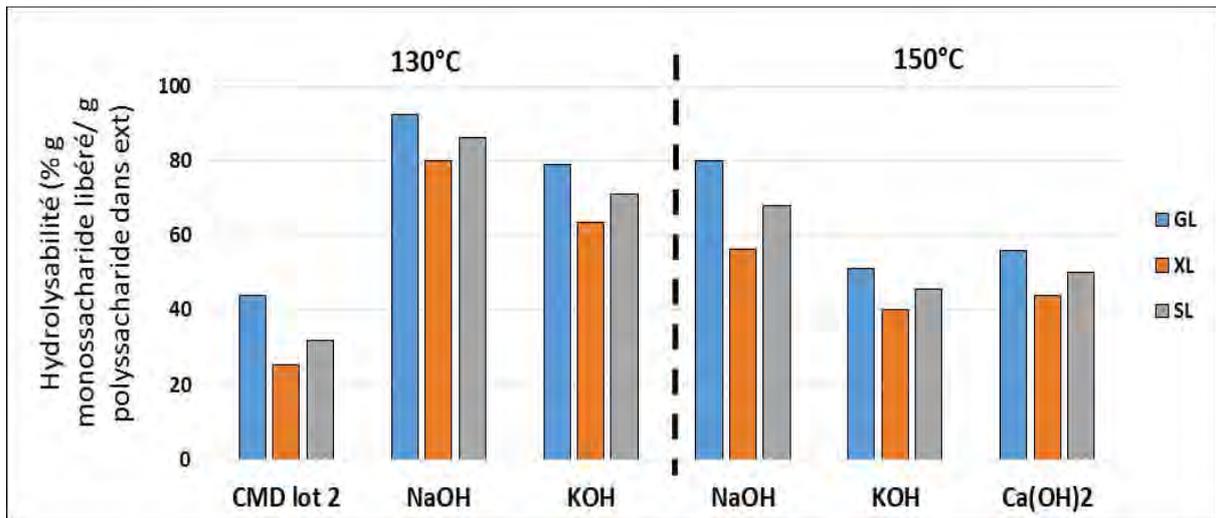
La perte en lignines et hémicelluloses sont des indicateurs indirects de l'accessibilité des enzymes à la cellulose. Les informations ainsi obtenues ont été complétées par une mesure de l'hydrolysabilité des extrudats (**Figure 2.8** et **Tableau 2.11**).

L'hydrolyse enzymatique des extrudats obtenus avec du NaOH et du KOH à une température de 130°C, montrent de meilleurs taux de conversion avec NaOH qu'avec KOH. Quant aux résultats obtenus à 150°, ils confirment l'efficacité de NaOH comparée à celle de KOH et Ca(OH)<sub>2</sub>. Afin d'atteindre des taux de conversion comparables à ceux obtenus avec NaOH, des concentrations en KOH et Ca(OH)<sub>2</sub> plus élevées ou des temps de mise en contact croissants sont sans doute nécessaires. En ce qui concerne Ca(OH)<sub>2</sub>, les plus faibles performances obtenues sont sûrement relié à la présence dans l'extrudat d'une fraction en lignines et en hémicelluloses plus élevée. Les résultats des taux de conversion en sucre sont en accord avec la composition des extrudats, lorsque celui-ci contient plus d'hémicelluloses, une accessibilité plus faible est obtenue.

**Tableau 2.11** Hydrolysabilité des extrudats après 48h obtenus en utilisant différentes bases à une concentration de R: 6.0% en g de NaOH équivalents pour 100 g de matière sèche et des températures de fourreau de 130°C et 150

Essai	Base	OH-/CMD sec	NaOHeq/CMD sec	T fourreau 3 et 4 mesurée	GL	XL	SL
		mol/Kg	%	°C	% (g glucose libéré /g de glucose potentiel dans extrudat)	% (g xylose libéré /g de xylose potentiel dans extrudat)	% (g xylose et glucose libéré /g de xylose et glucose potentiel dans extrudat)
CMD lot 2					43,9	25,3	31,9
1	NaOH	1,6	6,4	130	92,3	79,8	86,1
2	NaOH	1,6	6,4	150	79,8	56,2	68,0
3	KOH	1,6	6,4	130	78,8	63,5	71,2
4	KOH	1,7	6,8	150	51,0	40,2	45,6
5	Ca(OH) <sub>2</sub>	1,55	6,2	150	55,9	44,0	49,9

Note : GL : Glucose libéré ; XL : Xylose libéré ; SL : Sucres libérés



**Figure 2.8** Hydrolysabilité des extrudats après 48h obtenus en utilisant différentes bases à une concentration de 6.0% en g de NaOH équivalents pour 100 g de matière sèche et des températures de fourreau de 130°C et 150°C ; Note : GL : Glucose Libéré ; XL ;Xylose libéré ; SL : Sucres Libérés

En conclusion, cette étude préliminaire a permis de faire ressortir que  $\text{Ca(OH)}_2$  n'est pas adapté pour ce procédé. D'autre part, en ce qui concerne la soude et la potasse, des études plus poussées pour évaluer l'effet de la concentration et de la température sur leur efficacité est nécessaire. La soude est plus efficace en termes de solubilisation des hémicelluloses et des lignines. Toutefois, à 130°C la potasse conduit à des taux de conversion qui se rapprochent de ceux de la soude. Elle présente en parallèle l'intérêt de conduire après neutralisation à des sels de potassium dans le filtrat plus facilement valorisable que des sels de sodium.

### 2.3.3 Etude de l'influence de la température de la charge en alcalin: cas de NaOH et de $\text{H}_3\text{PO}_4$

Une étude complémentaire a été menée étudier la possibilité de compenser une réduction de la concentration en agent alcalin par une augmentation de la température. Dans un premier temps, la température est fixée à 150°C et les concentrations en soude (par Kg de coproduit de maïs doux) ont varié de 1,6% à 9% (Tableau 2.12).

**Tableau 2.12** Conditions d'extrusion pour de l'impact du ratio NaOH/CMD sec à 150°C en température du prétraitement.

Essai		1	2	3	4	5	6
Ss	tr/min	220	220	220	220	220	220
Q <sub>S</sub>	kg/h	4,2	3,6	3,0	3,6	3	3,3
Q <sub>NaOH</sub>	kg/h	3	3	3	2,8	2,8	2,7
<b>[NaOH]</b>	<b>%</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
T consigne	°C	150	150	150	150	150	150
<b>OH-/CMD sec</b>	<b>mol/Kg</b>	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>	<b>1,3</b>	<b>2,1</b>	<b>2,2</b>
<b>NaOH/CMD sec</b>	<b>%</b>	<b>1,6</b>	<b>3,7</b>	<b>4,6</b>	<b>5,2</b>	<b>8,3</b>	<b>9,0</b>
Q <sub>acide</sub>	Kg/h	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	%	1,5	1,5	1,5	1,14	3,03	3,8
Q <sub>ext</sub>	Kg/h	5,1	4,9	4,7	6,2	12,8	15,1
<b>MS ext</b>	<b>%</b>	<b>50,6</b>	<b>43,7</b>	<b>38,3</b>	<b>32,5</b>	<b>19,7</b>	<b>19,3</b>
pH ext		5	5	5	5	5	5
Q <sub>fil</sub>	Kg/h	11	10,4	10,1	9,9		
MS fil	%	5,3	6,3	7,8	9,4	Pas de filtrat	Pas de filtrat
MM fil	%MS	22,4	28,9	26,7	26,0		
L/Sb	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	0,9	1,0	1,2	0,9	1,0	0,9
L/Sa	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	3,3	3,7	4,5	3,6	3,8	3,3
Base/acide	mol/mol	1,9	2,0	2,0	3,8	1,9	1,8

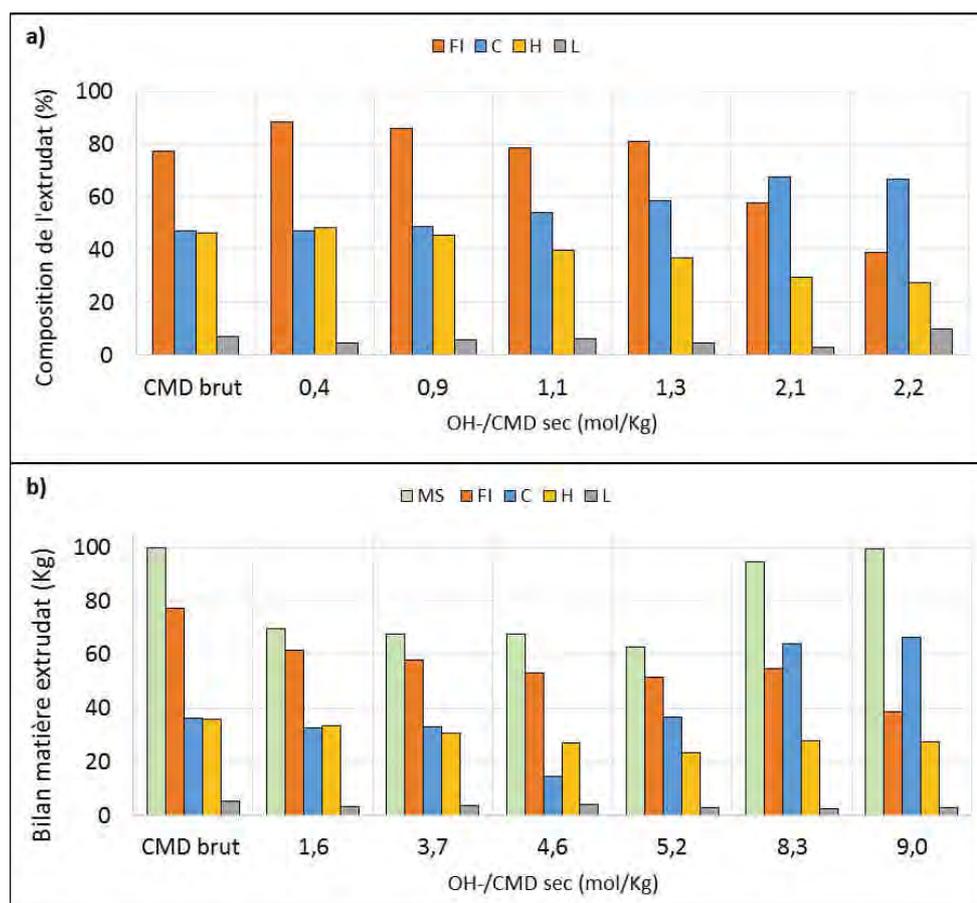
Ss : Vitesse de vis ; Q<sub>S</sub> : Débit solide entrée ; CMD : Coproduit de maïs Doux ; Q<sub>NaOH</sub> et Q<sub>acide</sub>: débit solution de soude et de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> respectivement ; [NaOH] et [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]: concentrations respectives des solutions de soude et d'acide; L/Sb et L/Sa : Ratio liquide/solide respectifs pour l'introduction de la soude et acide; T : température consigne du fourreau; Q<sub>filtrat</sub> et Q<sub>extrudat</sub> : débits respectifs de sortie du filtrat et de l'extrudat ; MS :Matière Sèche

La caractérisation des extrudats, en termes de matière sèche, matière minérale et composition a permis d'évaluer l'efficacité du prétraitement à solubiliser la lignine et les hémicelluloses, ainsi que de dresser un bilan massique (**Tableau 2.12** et **Figure 2.9**). D'un côté la composition de l'extrudat permet de définir la composition du substrat obtenu et son potentiel en sucres hydrolysables. Et d'autre part, le bilan matière, calculé sur la base d'entrée de 100Kg de matière sèche de coproduit de maïs doux dans l'extrudeur, vise à évaluer les performances du procédé.

**Tableau 2.13** Caractéristiques de l'extrudat obtenu en matière sèche, fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignine (L) et résultats pour le bilan matière obtenu avec 100Kg de matière sèche de coproduit de maïs doux introduit

Essai	NaOH/ CMD sec	OH-/CMD sec	Composition extrudat					Bilan matière pour 100Kg de matière sèche de CMD				
			MS	FI	C	H	L	MS	FI	C	H	L
Unité	%	mol/Kg	%	%MS	% FI	%FI	%FI	Kg	Kg	Kg	Kg	Kg
CMD lot 2			89,8	77,3	47	46,3	7	100	77,3	36,3	35,8	5,4
1	1,6	0,4	50,6	88,5	47,1	48,2	4,8	69,7	61,6	32,8	33,5	3,3
2	3,7	0,9	43,7	85,8	48,8	45,5	5,7	67,7	58,1	33,0	30,8	3,8
3	4,6	1,1	38,3	78,5	54,0	39,8	6,2	67,7	53,2	14,5	27,0	4,2
4	5,2	1,3	32,5	81,2	58,4	37,1	4,5	62,8	51,4	36,7	23,3	2,8
5	8,3	2,1	19,7	57,8	67,7	29,4	2,9	94,9	54,8	64,3	27,9	2,7
6	9,0	2,2	19,3	39,0	66,7	27,5	9,8	99,6	38,8	66,5	27,4	2,9

Note : CMD : Coproduit de Maïs Doux ; MS : Matière Sèche ; FI (Fraction Insoluble) ; C : Cellulose ; H : Hémicelluloses ; L : Lignines



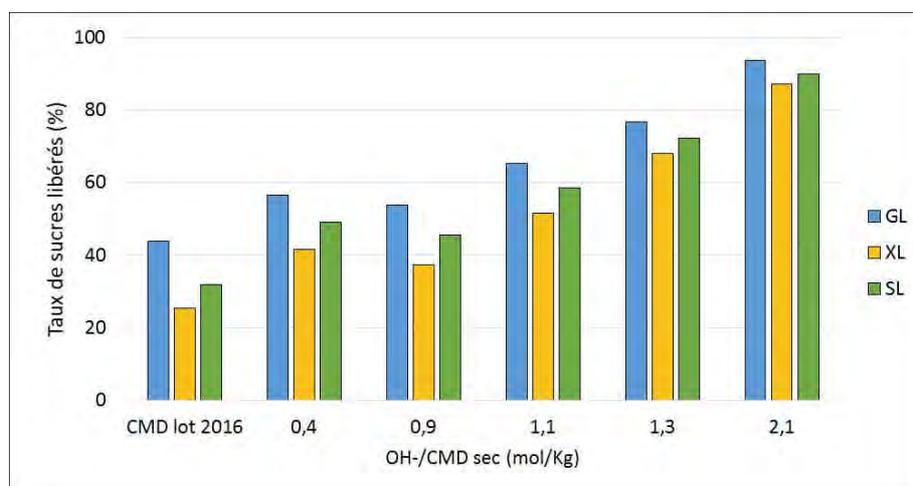
**Figure 2.9** Résultats de la composition des extrudats fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignines (L) (a) et du bilan matière pour 100Kg de matière sèche entrante de l'extrudat (b)

Les résultats obtenus sur la composition de l'extrudat montrent une diminution de la FI ou fraction lignocellulosique. De même, l'augmentation de la proportion en soude se traduit par une perte de la partie hémicellulosique et une augmentation de la fraction de cellulose de l'extrudat. Celle de fibre insoluble est réduite du fait de la solubilisation des hémicelluloses et des lignines. Le bilan matière reflète ainsi cette perte en fibre insoluble par rapport à la matière initiale, et des hémicelluloses et lignines avec l'apport en soude. Quant au rendement en cellulose obtenu, celle-ci reste relativement, conservé aux environs de 40Kg obtenus pour 100 Kg de CMD, soit 40Kg de cellulose introduite. En contrepartie, si bien une augmentation de la charge en alcalin permet une solubilisation des composés responsables de la récalcitrante, l'efficacité de la filtration y est affectée. Dans le cas des essais 5 et 6, la filtration n'a pas été possible, dû à une déstabilisation du bouchon dynamique provoqué par une forte destruction de la matière. Ces échantillons montrent une matière sèche beaucoup plus faible (autour de 19%) que celle obtenue dans les autres essais.

**Tableau 2.14** Hydrolysabilité des extrudats obtenus par modification de la charge en soude à 150°C

Essai	NaOH/CMD sec	OH-/CMD sec	GL	XL	SL
Unité	%	mol/Kg	% (g glc/g de cellulose dans extrudat)	% (g xyl libéré /g d'hémicelluloses dans extrudat)	% (g xyl et glc libéré /g de cellulose et hémicelluloses dans extrudat)
CMD lot 2016			43,9	25,3	31,9
1	1,6	0,4	56,6	41,6	49,1
2	3,7	0,9	53,8	37,4	45,6
3	4,6	1,1	65,4	51,5	58,45
4	5,2	1,3	76,8	67,9	72,35
5	8,3	2,1	93,8	87,3	90

Note : GL : Glucose libéré ; XL : Xylose libéré ; SL : Sucres libérés



**Figure 2.10** Hydrolysabilité des extrudats obtenus avec une température de fourreau à 150°C et des concentrations croissantes en OH-/CMD (%Kg/Kg)

L'hydrolyse enzymatique dans des conditions identiques (**Figure 2.10**) montre une augmentation des taux de conversion du glucose et du xylose, ce qui reflète une meilleure accessibilité des enzymes à la cellulose et aux hémicelluloses par les enzymes. La croissante solubilisation des hémicelluloses et lignines par la hausse en concentration de soude permet ainsi une amélioration du taux de conversion des sucres présents dans l'extrudat.

Une deuxième étude en employant NaOH, à des ratio NaOH/CMD sec de 3,4% et 5,5% et des températures entre 160°C à 200°C et 130 à 150°C respectivement, a ensuite été réalisée afin d'explorer l'effet de la température à ces concentrations (**Tableau 2.15**).

**Tableau 2.15** Conditions opératoires pour la deuxième étude avec NaOH et H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, modification de la température de prétraitement

Essai		1	2	3	4	5	6	7
Ss	tr/min	220	220	220	220	220	220	220
Q <sub>S</sub>	kg/h	3,7	3,6	3,7	3,4	3,6	2,1	3,1
Q <sub>NaOH</sub>	kg/h	2,7	3	2,8	2,8	2,8	3	3
[NaOH]	%	4	4	4	4	4	6	6
<b>T consigne prétraitement</b>	<b>°C</b>	<b>130</b>	<b>150</b>	<b>170</b>	<b>180</b>	<b>200</b>	<b>130</b>	<b>150</b>
<b>OH-/CMD sec</b>	<b>mol/Kg</b>	<b>0,82</b>	<b>0,93</b>	<b>0,84</b>	<b>0,92</b>	<b>0,87</b>	<b>1,31</b>	<b>1,39</b>
<b>NaOH/CMD sec</b>	<b>%</b>	<b>3,3</b>	<b>3,7</b>	<b>3,4</b>	<b>3,7</b>	<b>3,5</b>	<b>5,3</b>	<b>5,5</b>
Q <sub>acide</sub>	Kg/h	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	10,4
[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	%	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,14	1,14
Q <sub>ext</sub>	Kg/h	4,9	4,9	5,1	4,8	4,8	6,6	6,2
MS ext	%	46,3	43,66	43,28	43,8	44,4	33,6	32,5
pH ext		5	5	5	5	5	5	5
Q <sub>fil</sub>	Kg/h	10,4	10,4	10,6	10,9	10,7	9,5	9,9
MS fil	%	6,02	6,3	6,3	10,9	6,1	9,46	9,42
MM fil	%MS	29,6	28,9	28,3	29,23	28,8	30,0	26,0
L/Sb	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	0,9	1,0	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9
L/Sa	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	3,5	3,7	3,5	2,9	3,6	3,4	3,9
Base/acide	mol/mol	1,9	2,0	1,9	1,9	1,9	4,0	3,7

Ss : Vitesse de vis ; Q<sub>S</sub> : Débit solide entrée ; CMD : Coproduit de maïs Doux ; Q<sub>NaOH</sub> et Q<sub>acide</sub>: débit solution de soude et de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> respectivement ; [NaOH] et [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]: concentrations respectives des solutions de soude et d'acide; L/Sb et L/Sa : Ratio liquide/solide respectifs pour l'introduction de la soude et acide; T : température consigne du fourreau; Q<sub>fil</sub> et Q<sub>ext</sub>: débits respectifs de sortie du filtrat et de l'extrudat ; MS :Matière Sèche

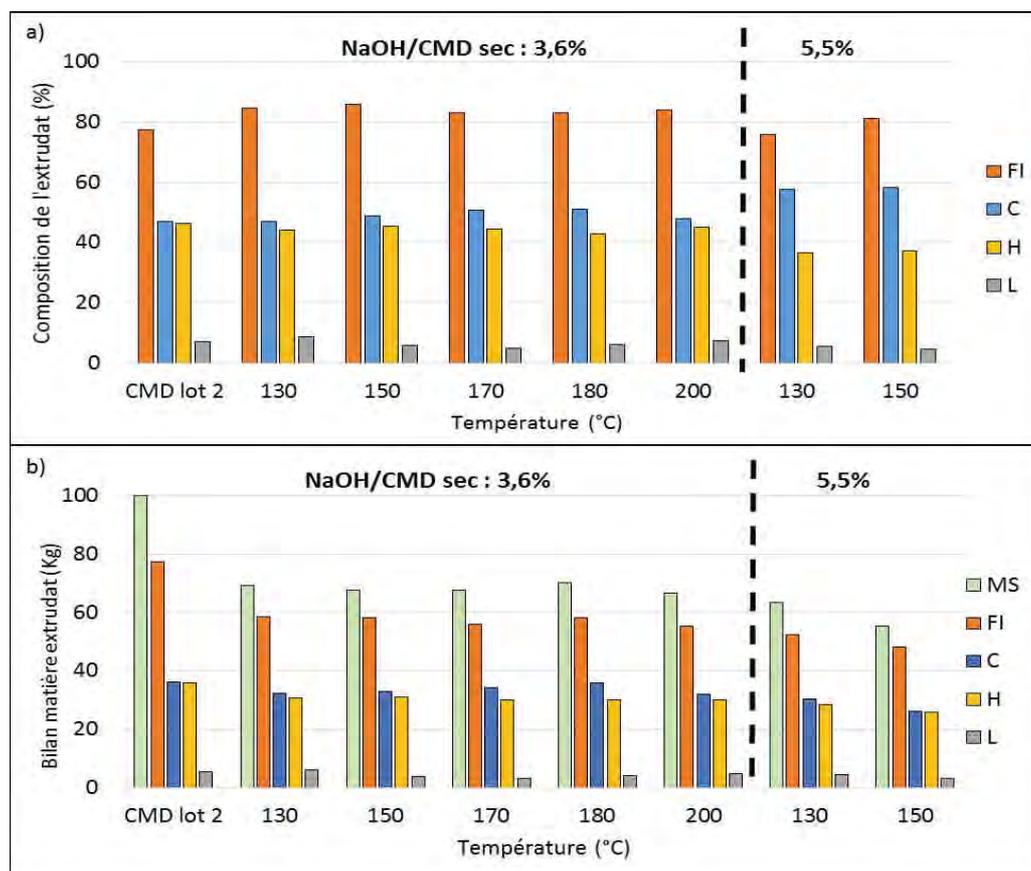
La composition en termes de fibre insoluble, et les fractions qui la composent, quel que soit la charge en catalyseur utilisée, est peu affectée par la température (**Tableau 2.16** et **Figure 2.11**). A 3,4% et à 5,5%, le passage à 200°C et à 150°C n'a pas autant d'impact que celui observé par l'augmentation de

la charge en soude. Le bilan matière pour 100Kg de CMD sec suit cette tendance. Ainsi la température, dans les conditions étudiées, montre un impact relativement faible sur l'efficacité du prétraitement à solubiliser les hémicelluloses et lignines.

**Tableau 2.16** Caractéristiques de l'extrudat obtenu en matière sèche (MS), fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignine (L) et résultats pour le bilan matière obtenu avec 100Kg de matière sèche de coproduit de maïs doux introduit

Essai	OH-/CMD sec	NaOH/CMD sec	T °C	Composition extrudat					Bilan matière pour 100Kg de matière sèche de CMD				
				MS	FI	C	H	L	MS	FI	C	H	L
				%	%MS	% FI	%FI	%FI	Kg	Kg	Kg	Kg	Kg
CMD lot 2				89,8	77,3	47	46,3	7	100	77,3	36,3	35,8	5,4
1	0,82	3,3	130	46,3	84,8	46,9	44,3	8,8	69,1	58,6	32,4	30,6	6,0
2	0,93	3,7	150	43,7	85,8	48,8	45,5	5,7	67,7	58,1	33,0	30,8	3,8
3	0,84	3,4	170	43,3	83,1	50,6	44,6	4,8	67,4	56,0	34,1	30,0	3,2
4	0,92	3,7	180	43,8	83,0	51,1	42,9	6,0	70,2	58,3	35,8	30,1	4,2
5	0,87	3,5	200	44,4	84,0	47,8	45,0	7,3	66,6	55,3	31,8	29,9	4,9
6	1,31	5,3	130	33,6	76,0	57,8	36,7	5,5	63,3	52,3	30,4	28,4	4,4
7	1,39	5,5	150	32,5	81,2	58,4	37,1	4,5	55,1	48,0	26,2	25,8	3,1

Note : CMD : Coproduit de Maïs Doux ; MS : Matière Sèche FI (Fraction Insoluble) ; C : Cellulose ; H : Hémicelluloses ; L : Lignines

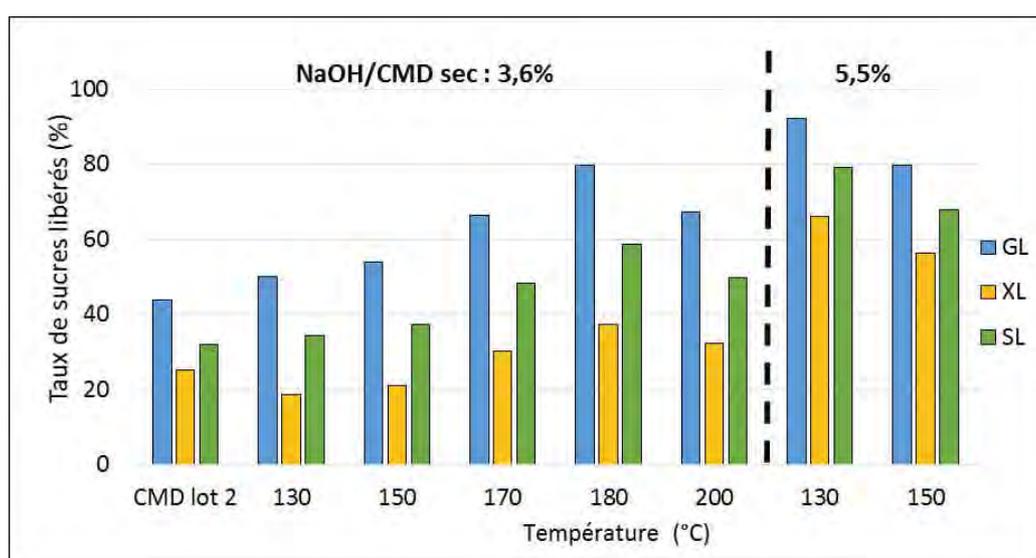


**Figure 2.11** Composition des extrudats fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignine (L) (a) et bilan matière pour 100Kg de matière sèche entrante de l'extrudat (b)

Lors de l'hydrolyse enzymatique dans des conditions optimales, il est obtenu un taux de glucose et en xylose libérés inférieur à NaOH/CMD sec de 3,5% que à 5,5 %, ce qui produit comme précédemment le rôle prépondérant du taux de catalyseur pour améliorer l'accessibilité de enzymes à leur substrat (**Tableau 2.12** et **Figure 2.12**). On remarque cependant que à 3,5%, les taux de conversion en sucres est amélioré par la hausse de la température appliquée lors du prétraitement jusqu'à 180°C. Lors que cette température est atteinte une diminution de l'efficacité des enzymes à dégrader la cellulose et les hémicelluloses est observée. De plus à 5,5%, l'effet néfaste de la température sur l'hydrolyse des extrudats est aussi observé lors du passage de 130°C à 150°C. Cette étude montre ainsi que si la température peut jouer un rôle positif sur l'accessibilité des enzymes, une augmentation trop poussé peut aussi avoir un impact négatif.

**Tableau 2.17** Hydrolysabilité des extrudats obtenus par modification de la température de fourreau des modules de prétraitement

Essai	OH-/CMD sec mol/Kg	NaOH/CMD sec %	T °C	GL % (g glc/g de cellulose dans extrudat)	XL % (g xyl libéré /g d'hémicelluloses dans extrudat)	SL % (g xyl et glc libéré /g de cellulose et hémicelluloses dans extrudat)
CMD lot 2				43,9	25,3	31,9
1	0,8	3,3	130	50,1	18,7	34,4
2	0,9	3,7	150	53,8	21	37,4
3	0,8	3,4	170	66,5	30,3	48,4
4	0,9	3,7	180	79,8	37,4	58,6
5	0,9	3,5	200	67,2	32,2	49,7
6	1,3	5,3	130	92,3	66,0	79,1
7	1,4	5,5	150	79,8	56,2	68



**Figure 2.12** Hydrolysabilité des extrudats obtenus avec une température de fourreau à 150°C et des concentrations croissantes en NaOH/CMD

### 2.3.4 Conclusion

Au vu de l'ensemble des résultats préliminaires obtenus sur l'extrudeur BC21, il apparaît que :

- Le choix de l'alcalin est important, les meilleurs résultats sont obtenus avec NaOH. Toutefois, KOH, permet d'obtenir des résultats assez proches et présente l'intérêt de conduire après neutralisation des sels plus facilement valorisables
- La réduction du ratio OH-/CMD sec conduit à une perte de l'efficacité du prétraitement. Notamment, par une diminution de la déstructuration du substrat, et par conséquent de son hydrolysabilité
- La température a moins d'impact sur l'efficacité du prétraitement que la concentration en agent alcalin, cependant son augmentation peut permettre une diminution de celle-ci
- Les différentes conditions utilisées lors de ces essais préliminaires ont permis de mettre en évidence un point critique du procédé : une déstructuration trop importante de la matière conduit à une texture du bouchon dynamique qui peut s'avérer trop faible pour maintenir la filtration

L'extrudeur BC21, comme évoqué précédemment, est composé de 7 modules. Cependant, la mise en place du prétraitement, neutralisation, filtration et de la bioextrusion requiert des modules supplémentaires, notamment afin d'augmenter le temps de résidence de la matière dans l'extrudeur lors de l'étape de bioextrusion. Pour cette raison, les études d'optimisation ont été transférées sur un extrudeur de type EV25, possédant 10 modules. D'autre part, les études suivantes ont aussi été réalisées avec de l'acide sulfurique pour la neutralisation. Cet acide possède un prix et un impact écologique plus faible que l'acide phosphorique, raison pour laquelle il a été évalué comme agent neutralisant.

## 2.4 Optimisation du prétraitement dans le procédé global de transformation du substrat lignocellulosique en éthanol au stade laboratoire

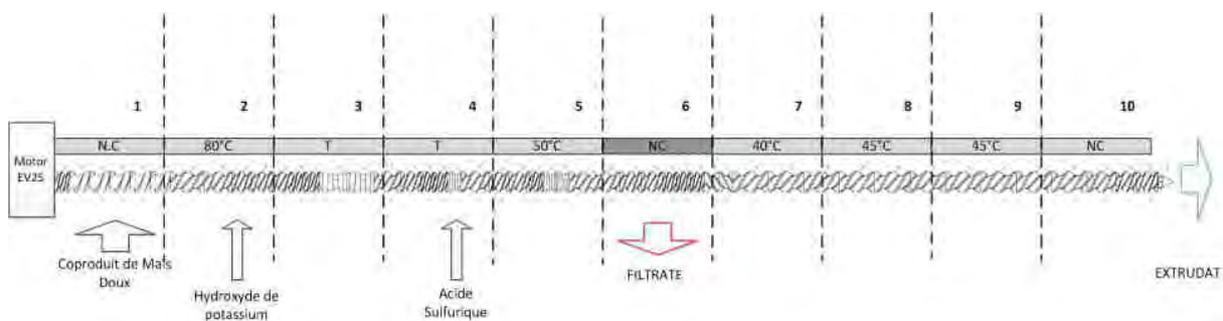
### 2.4.1 Etude du prétraitement avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### 2.4.1.1 Mise en place de l'extrudeur et conditions d'expérimentation

L'optimisation de la concentration en KOH et de la température appliquées pendant le prétraitement alcalin a été réalisée sur un extrudeur de type EV25 (Cletral, France), extrudeur à 10 modules de fourreau et permettant de travailler à un débit d'entrée de 1 à 10Kg/h.

Le profil de vis mis en place pour cette étude, est adapté de celui utilisé dans le projet BABETHANOL sur un extrudeur de type EV53 (**Figure 2.13** et **Tableau 2.18**), ce profil de vis n'ayant pas été testé auparavant sur EV25. Le profil de vis comporte les zones de convoyage au niveau de l'entrée de la matière solide et du transport des mélanges, 3 zones de cisaillement/mélange assurée par des vis de

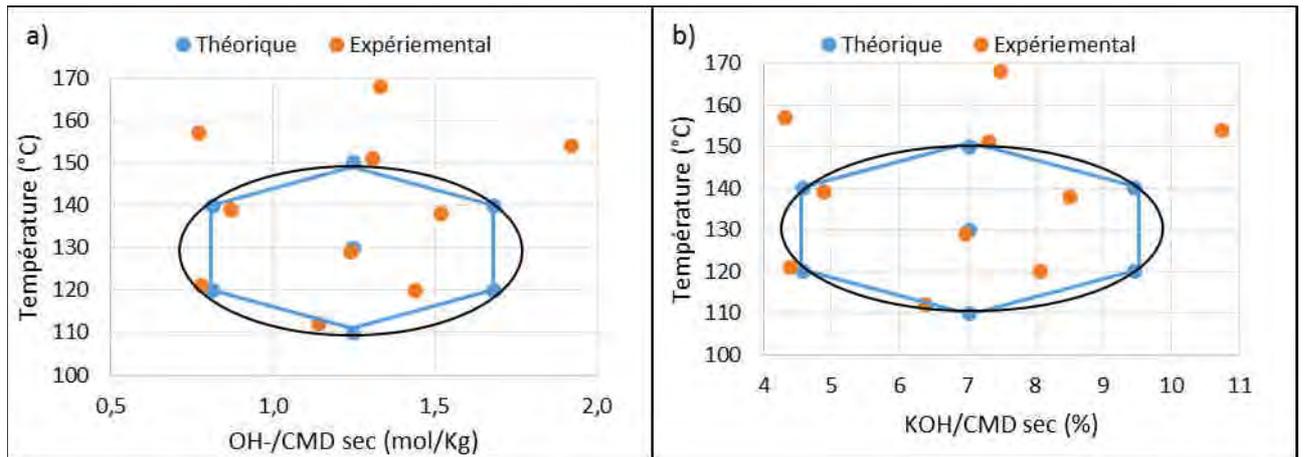
type bilobes pour le prétraitement alcalin et la neutralisation dans les modules 3,4 et 5, et une zone de fort cisaillement comportant des contrefilets. Ces derniers vont assurer la formation du bouchon dynamique permettant la filtration. Cette région de filtration est située au niveau du module 6 comportant le filtre. Le profil de vis mis en place à partir du module 7 jusqu'au module 10 est composé de vis de convoyage. Cette zone correspond à la zone de bioextrusion et par la suite des éléments de mélange seront rajoutés pour étudier l'imprégnation des enzymes. Mais dans cette étude les enzymes ne sont pas introduites. Comme précédemment, l'introduction de l'alcalin et de l'acide se font au niveau des modules 2 et 4. Les ratios liquide/solide pour le prétraitement et la neutralisation sont fixés respectivement à 1 et 4, basés sur les études réalisées auparavant.



**Figure 2.13** Schéma de la configuration employée pour l'étude de l'impact de la température (T) et la charge en alcalin sur le prétraitement avec KOH

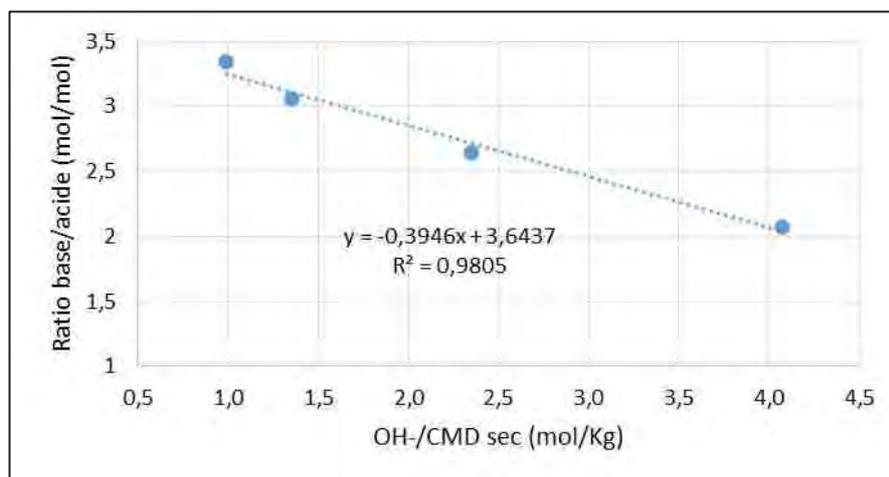
Un plan d'expérience de Doehlert à deux facteurs a été mis en place, les facteurs sont : la concentration en alcalin et la température de fourreau. Le domaine expérimental a été choisi en s'appuyant sur les résultats obtenus lors des études préliminaires. Il s'étend de 110°C à 170°C pour la température et de 0,75 mol/Kg à 1,75mol/Kg pour le ratio OH-/CMD sec. Les valeurs au centre du domaine sont un ratio OH-/CMD sec de 1.25 mol/Kg (7,0 %) et une température de 130°C. Il est à noter que les variations du débit de la matière entrante lors des expériences et de la température ont provoqué des modifications des points du plan d'expérience, provoquant un décalage par rapport au point théorique souhaité (**Figure 2.14**).





**Figure 2.14** Plan d'expérience théorique (bleu) et expérimental (rouge) pour étude de l'influence de la température et de la charge en alcalin exprimée en OH-/CMD sec (a) et en KOH/CMD sec (b)

La quantité d'acide nécessaire pour obtenir les conditions de pH acceptable pour l'introduction ultérieure des enzymes ont été estimées au laboratoire dans des erlenmeyers afin d'obtenir un pH de 5. Le coproduit de maïs doux a été mélangé avec du KOH aux concentrations en OH-/CMD sec, puis un titrage a été réalisé avec une solution d'acide sulfurique pure pour obtenir un pH final de 5 (**Figure 2.15**). Pour chaque concentration correspondant aux essais d'extrusion en OH-/CMD sec, les conditions théoriques permettant d'assurer la neutralisation ont été déterminées en respectant les ratios liquides/solides dans les zones de prétraitement et neutralisation (**Tableau 2.19**). Lors de chaque essai d'expérimentation sur l'extrudeur la quantité d'acide a été ajustée, de manière à obtenir un pH de 5 pour l'extrudat et de 4 au niveau du filtrat. Le pH a été contrôlé à l'aide d'un papier pH.



**Figure 2.15** Conditions de neutralisation du CMD prétraité utilisé obtenir un pH proche de 5 en fonction du ratio OH-/CMD sec pendant les essais en erlenmeyer

**Tableau 2.19** Conditions de prétraitement alcalin et neutralisation pour étude avec KOH

NaOH/CMD sec équivalent % (Kg/Kg)	OH-/CMD sec mol/Kg	Ratio base/acide mol/mol	KOH/CMD sec % (Kg/Kg)	Q KOH			Q H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
				MS kg/h	Liquide kg/h	Total kg/h	MS kg/h	Liquide kg/h	Total kg/h
3	0,75	3,3	4,2	0,07	1,50	1,57	0,036	5,20	5,237
5	1,25	3,2	7,0	0,11	1,55	1,66	0,063	5,45	5,510
7	1,75	3,0	9,8	0,16	1,60	1,75	0,094	5,71	5,802

Q KOH : Débit d'hydroxyde de potassium ; QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Débit acide sulfurique

#### 2.4.1.2 Plan d'expérience et analyse statistique

Le **Tableau 2.21** regroupe l'ensemble des points expérimentaux du plan d'expérience en utilisant du KOH et du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les extrudats ont par la suite été analysés en termes de composition en fibre insoluble, cellulose, hémicelluloses et lignines (cf. Chapitre 5). A partir des données de caractérisation et du bilan de matière pour 100Kg de matière sèche de coproduits de maïs doux, les quantités de cellulose, hémicelluloses et lignines, obtenues pour 100Kg de CMD, ont été calculé et les rendements en cellulose (CC), les hémicelluloses retirées (HR) et le taux de délignification (DL) déterminés par les équations 2.1, 2.2 et 2.3:

$$CC = ((C \text{ dans extrudat}) / (C \text{ dans } 100\text{Kg de CMD sec})) \times 100 \quad \text{Eq.2.1}$$

$$HR = ((H \text{ dans CMD} - H \text{ dans extrudat}) / (H \text{ dans CMD})) \times 100 \quad \text{Eq.2.2}$$

$$DL = ((L \text{ dans CMD sec} - L \text{ dans extrudat}) / (L \text{ dans CMD sec})) \times 100 \quad \text{Eq.2.3}$$

Où C dans CMD est la cellulose contenue dans 100Kg de CMD sec et C dans extrudat est la cellulose contenue dans l'extrudat produit à partir des 100Kg de CMD sec. Le même principe est appliqué à H et L qui correspondent aux hémicelluloses et lignines. C, H et L sont exprimés en kilogrammes.

De plus, l'hydrolysabilité des extrudat a été réalisée pendant 24h et 48h, dans le but d'analyser le taux de sucres libérés (Equations 2.4, 2.5 et 2.6) et les rendements du procédé :

$$GL = m \text{ glucose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ C dans extrudat} * 1.1 * 100 \quad \text{Eq. 2.4}$$

$$XL = m \text{ xylose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ H dans extrudat} * 1.1 * 100 \quad \text{Eq. 2.5}$$

$$SL = (m \text{ glucose} + m \text{ xylose libéré (corrigés avec blanc)}) / (m \text{ H dans extrudat} * 1.1 + m \text{ C dans extrudat} * 1.1) * 100 \quad \text{Eq. 2.6}$$

Où m glucose et xylose libérés correspondent aux masses produites après 24h ou 48h, exprimées en grammes et C et H correspondent aux masses de cellulose et hémicelluloses contenues dans 0,5g d'extrudat. Les valeurs 1,1 correspondent aux facteurs de conversion de glucanes en glucose (180/162) et des hémicelluloses en xylose et arabinose (150/132).

$$GR = m \text{ glucose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ CMD sec} * 100 \quad \text{Eq. 2.7}$$

$$XR = m \text{ xylose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ CMD sec} * 100 \quad \text{Eq. 2.8}$$

$$SR = (m \text{ glucose} + m \text{ xylose libéré (corrigés avec blanc)}) / m \text{ CMD sec} * 100 \quad \text{Eq. 2.9}$$

Où m es la masse en grammes. La masse de CMD sec a été calculé de la manière suivante :  $m \text{ CMD sec} = \text{ratio} (Q_{\text{ext}}/Q_{\text{CMD}}) * 0.5\text{g}$ , où  $Q_{\text{ext}}$  est le débit sec d'extrudat et  $Q_{\text{CMD}}$  est le débit de CMD sec.

A partir des résultats obtenus, l'analyse statistique a été réalisée sur NemrodW<sup>®</sup>. Les paramètres étudiés, ratio OH-/CMD sec et température de fourreau, ont été normalisés selon la méthode de Z-score (**Tableau 2.20**). Le modèle mathématique utilisé avec les plans d'expérience à 2 facteurs pour tracer les surface de réponse est décrit par un modèle du second degré (équation 2.10) :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 \quad \text{Eq. 2.10}$$

Avec Y la réponse. Les variables X1 et X2 correspondent aux paramètres normalisés, ratio OH-/CMD sec équivalent et température de fourreau respectivement. Les réponses ont ainsi été corrélées aux coefficients du centre du domaine  $a_0$ , linéaires ( $a_1$  and  $a_2$ ), interactions ( $a_{12}$ ) and quadratiques ( $a_{11}$  and  $a_{22}$ ).

**Tableau 2.20** Données normalisées du plan d'expérience KOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Numéro échantillon	T fourreau module 3 mesurée	KOH/CMD sec	X1= KOH/CMD sec	X2= T° fourreau mesurée
	°C	%		
1	168	7,5	0,0	1,0
2	151	7,3	-0,1	0,4
3	129	7,0	-0,2	-0,4
4	112	6,4	-0,4	-1,0
5	121	4,4	-1,0	-0,7
6	139	4,9	-0,8	0,0
7	157	4,3	-1,0	0,6
8	120	8,1	0,2	-0,7
9	138	8,5	0,3	-0,1
10	154	10,8	1,0	0,5

**Tableau 2.21** Conditions opératoires pour étude de l'influence de la concentration en KOH et la température de fourreau

Essai		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ss	tr/min	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
QS	kg/h	1,8	1,8	1,9	2,1	1,8	1,6	1,8	2,0	1,9	1,5
Qsolution KOH	kg/h	1,7	1,7	1,7	1,7	1,5	1,5	1,5	1,7	1,7	1,7
[KOH]	%	6,9	6,9	6,9	6,9	4,8	4,8	4,8	8,9	8,9	8,9
T consignes modules 3 et 4	°C	170	150	130	110	120	140	160	120	140	160
<b>T mesurées modules 3 et 4</b>	<b>°C</b>	<b>168</b>	<b>151</b>	<b>129</b>	<b>112</b>	<b>121</b>	<b>139</b>	<b>157</b>	<b>120</b>	<b>138</b>	<b>154</b>
<b>OH-/CMD sec</b>	<b>mol/Kg</b>	<b>1,33</b>	<b>1,31</b>	<b>1,24</b>	<b>1,14</b>	<b>0,78</b>	<b>0,87</b>	<b>1,44</b>	<b>1,44</b>	<b>1,52</b>	<b>1,92</b>
<b>KOH/CMD sec</b>	<b>%</b>	<b>7,5</b>	<b>7,3</b>	<b>7,0</b>	<b>6,4</b>	<b>4,4</b>	<b>4,9</b>	<b>8,1</b>	<b>8,1</b>	<b>8,5</b>	<b>10,8</b>
Qsolution acide	Kg/h	5,3	5,3	5,3	5,9	6,5	6,5	6,5	6,0	6,0	6,6
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,1	1,1	1,1	1,1	0,7	0,7	0,7	2,1	2,1	2,1
Qext	Kg/h	3,2	3,3	3,5	3,8	2,9	2,5	3,0	3,9	3,7	6,0
MS ext	%	40,0	38,9	38,9	38,9	44,5	46,7	44,2	34,9	36,0	22,4
pH ext		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Qfil	Kg/h	4,6	5,0	5,0	5,7	6,5	6,5	6,1	5,2	5,2	1,9
MS fil	%	9,7	10,1	10,0	10,1	9,7	6,4	5,8	6,8	11,5	14,0
MM fil	%MS	30,6	32,0	29,4	30,7	27,4	29,6	28,0	25,8	33,9	30,5
L/Sb	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	1,1
L/Sa	Kg.h <sup>-1</sup> /kg.h <sup>-1</sup>	4,0	3,9	3,7	3,7	4,6	5,1	4,6	3,6	3,8	4,9
Base/acide	mol/mol	3,4	3,4	3,4	3,1	2,6	2,6	2,6	2,0	2,0	1,9

Ss : vitesse de vis; QS : Débit solide entrée ; Qbase et Qacide: débit solution de soude et H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> respectivement ; [KOH] et [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]: concentration de la solution d'hydroxyde de potassium et d'acide sulfurique respectivement; L/Sb et L/Sa : Ratio liquide/solide pour prétraitement alcalin et neutralisation ; T : température de fourreau des modules 3 et 4; Qfiltrat et Qextrudat : débits en sortie du filtrat et de l'extrudat respectivement

### 2.4.1.3 Résultats et discussions issus du plan d'expérience

#### 2.4.1.3.1 Influence de la température et du ratio OH-/CMD sur la composition de l'extrudat et la filtration

L'objectif du projet est de trouver les conditions d'un prétraitement économiquement viables. Celui-ci permet d'obtenir un substrat riche en cellulose et hémicelluloses (si co-fermentation envisagée) afin d'atteindre des rendements élevés en sucres fermentescibles. Il doit permettre d'accroître l'accessibilité des enzymes à leur substrat notamment par la destruction de l'une des fractions des lignines et des hémicelluloses. L'efficacité du prétraitement au KOH a été évaluée par la modification de la composition de l'extrudat obtenu et des rendements en cellulose, hémicelluloses et lignines. Les résultats de caractérisation des extrudats sont regroupés dans le **Tableau 2.22**.

**Tableau 2.22** composition des extrudats, des indicateurs des bilans massiques pour l'extrudat et caractéristiques du filtrat obtenus pour les essais réalisés avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en modifiant le ratio R exprimé en g de NaOH pour 100 de CMD sec équivalent et T, la température de fourreau mesuré

Essai	Conditions			Composition de l'extrudat				Indicateurs bilan massique pour l'extrudat				
	T °C	KOH/CMD sec %	OH-/CMD sec mol/Kg	IF %MS	C % FI (%MS)	H % FI (%MS)	L % IF (%MS)	MS Kg	CC %	DL %	HY %	HR %
CMD lot 2				77,0	47,0 (37,4)	46,0 (36,4)	7,0 (5,7)	100				
1	168	7,5	1,3	82,1	56,7 (46,5)	36,6 (30,0)	6,7 (5,5)	80,0	103,4	22,3	68,5	31,5
2	151	7,3	1,3	84,4	56,2 (47,4)	37,3 (31,5)	6,6 (5,5)	78,7	99,8	23,7	68,0	32,0
3	129	7	1,2	80,6	54,0 (43,6)	40,5 (32,7)	6,6 (4,4)	79,1	92,1	26,7	70,9	29,1
4	112	6,4	1,1	81,9	53,8 (44,0)	39,8 (32,6)	6,5 (5,3)	78,2	92,1	26,4	69,9	30,1
5	121	4,4	0,8	87,9	51,0 (44,9)	42,0 (36,9)	6,5 (6,2)	80,4	96,4	18,8	81,5	18,5
6	139	4,9	0,9	88,7	52,6 (46,7)	41,8 (37,1)	6,6 (4,9)	80,8	100,8	17,6	82,4	17,6
7	157	8,1	0,8	84,2	52,0 (43,8)	39,7 (33,4)	6,6 (7,0)	81,2	95,1	21,4	74,6	25,4
8	120	8,1	1,4	76,4	54,2 (41,4)	39,2 (29,9)	6,6 (5,1)	75,8	83,9	33,5	62,3	37,7
9	138	8,5	1,5	74,9	54,9 (41,1)	38,6 (28,9)	6,6 (4,9)	77,9	85,6	32,9	61,8	38,2
10	154	10,8	1,9	60,5	61,7 (37,4)	32,9 (19,9)	6,6 (3,3)	97,8	97,8	31,9	53,5	46,5

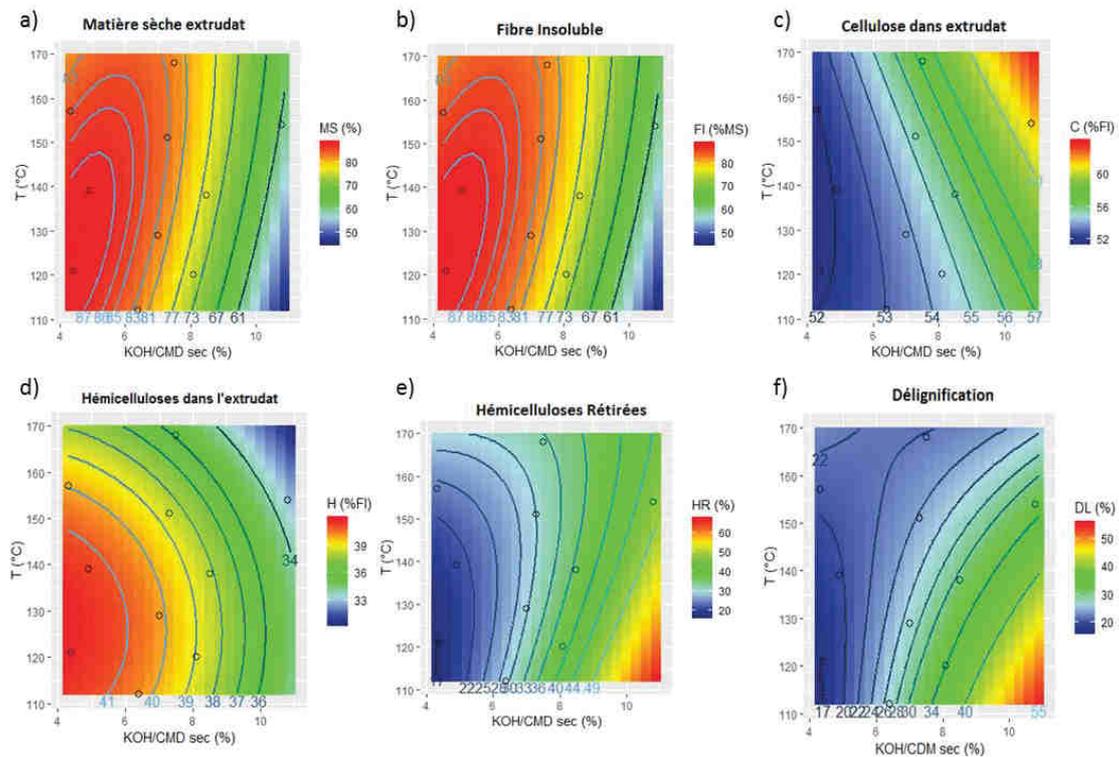
: MS : Matière Sèche ; FI: Fibre Insoluble ; C : Cellulose ; H: Hémicelluloses ; L : Lignines ; RC : Rendement en cellulose ; RH : Rendement en Hémicelluloses ; DL : Taux de Délignification ; HR : Taux d'hémicelluloses retirées

L'analyse statistique du modèle a permis de déterminer son  $R^2$ , coefficient de régression, cette valeur permet de montrer l'écart entre les valeurs expérimentales « mesurées » lors de l'expérience et celles calculées par le modèle. Dans cette étude, seules les réponses présentant un  $R^2$  supérieur à 0,8 ont été analysées par les courbes d'iso-réponse ; celles-ci correspondent à la matière sèche (MS), la fraction de fibre insoluble (FI), les fractions de cellulose et hémicelluloses contenues dans la fibre insoluble de l'extrudat, le taux de délignification (DL) et le taux d'hémicelluloses retirées (HR) (**Tableau 2.23** et **Figure 2.16**). Si cette valeur est inférieure à 0,9 comme dans le cas des hémicelluloses contenues dans l'extrudat, l'analyse des coefficients, comme la représentation en courbes d'iso réponse ne montre qu'une tendance globale de la réponse dans les conditions étudiées.

**Tableau 2.23** Analyse statistique de l'effet des paramètres et T sur la composition des extrudat et les indicateurs de bilan de masse

	MS		IF		Cellulose		Hémicelluloses		HR		DL	
ANOVA	0,194**		0,144**		0,94		0,782**		0,865**		0,402**	
Ecart type	1,46		1,66		0,988		0,847		1,846		2,335	
R <sup>2</sup>	0,979		0,982		0,953		0,957		0,954		0,969	
R <sup>2</sup> A	0,952		0,959		0,893		0,903		0,898		0,931	
PRESS	166,764		95,152		103,678		45,465		277,108		330,292	
Degrés de liberté	4		4		4		4		4		4	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
a0	39,1	<0,01***	81,41	<0,01***	54,37	<0,01***	39,208	<0,01***	31,362	<0,01***	26,78	<0,01***
a1	-12,09	0,0273***	-15,14	0,0175***	3,958	0,403**	-3,592	0,327**	16,004	0,0528***	10,344	0,114**
a2	1,92	12	3,06	4,82*	1,741	54	-1,716	3,63*	-2,426	18,7	-5,567	0,992**
a11	-5,63	1,52*	-9,45	0,359**	0,631	52,8	-1,246	18,8	3,879	14,7	2,19	26,9
a22	-2,04	23,7	-2,01	28,7	0,616	56,1	-1,667	11,6	3,76	17,7	0,945	63,1
a12	1,8	39,2	5,42	6,1	1,518	29	-0,087	93,9	-8,344	4,73*	-8,515	2,17*

Note : ANOVA : Analyse de variance; MS : Matière Sèche ; FI : Fibre Insoluble ; DL : taux de Délignification ; HR : taux d'Hémicelluloses Retirées ; C : Coefficient ; S : Significativité



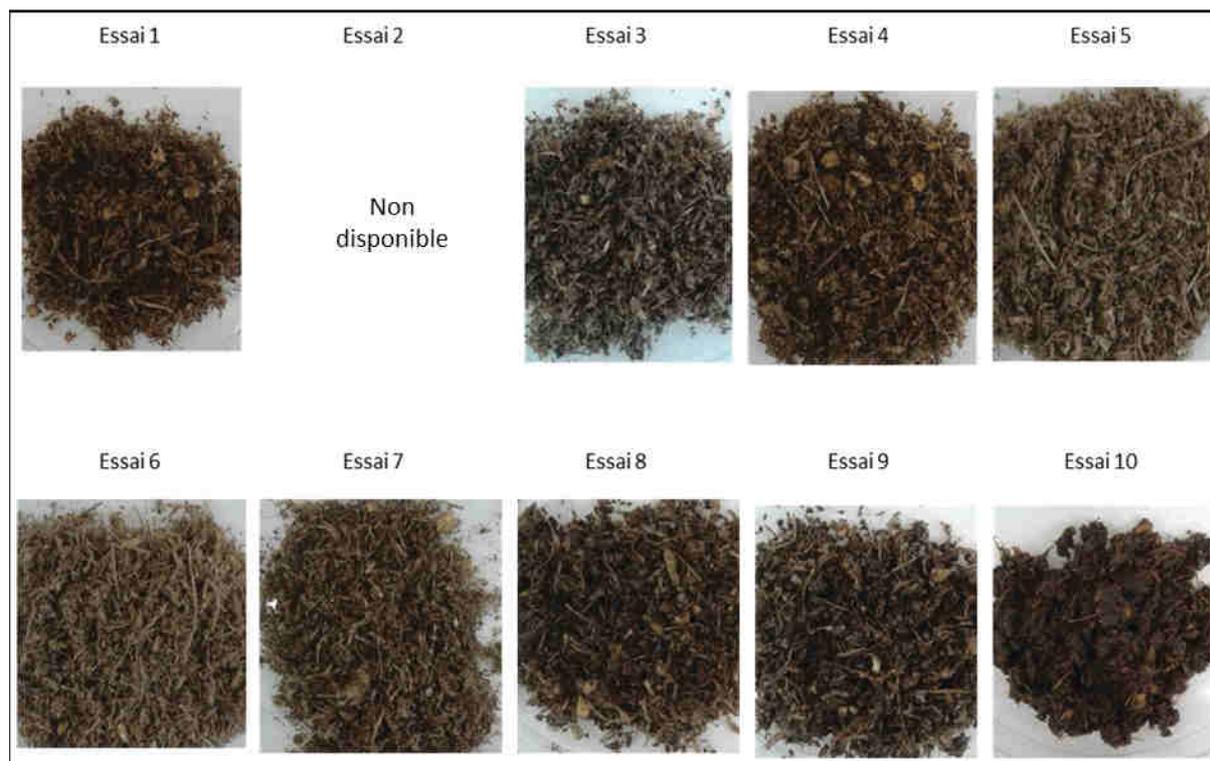
**Figure 2.16** Courbes d'iso réponse indiquant la matière sèche (%)(a), son taux de fibre insoluble (FI)(%MS)(b), la composition en cellulose (%FI) (c), en hémicelluloses (%FI)(d) dans l'extrudat, le taux d'hémicelluloses retirées (HR)(%)(e) et le taux de délignification (DL)(%) (f); les points en blanc marqués correspondent aux résultats des essais 1 à 10

Le taux de matière sèche de l'extrudat est un indicateur de la matière solide contenue dans l'extrudat. L'analyse des coefficients de cette réponse montre que le ratio KOH/CMD a une influence significative (**Tableau 2.23**). Au fur et à mesure que la concentration en KOH appliquée est augmentée, la matière sèche de l'extrudat diminue jusqu'à atteindre environ 20% à plus de 10.8% en KOH/CMD sec (**Figure 2.16 a**). Dans ces conditions, qui correspondent à celles de l'essai 10, la destructuration de la matière est telle que le bouchon dynamique est trop tendre pour assurer une filtration correcte de la matière. L'extrudat prétraité est pâteux en sortie de l'extrudeur (**Figure 2.17**). Ces conditions sont des conditions limites qu'il ne sera pas souhaitable d'atteindre afin d'assurer un régime stable du procédé. De la même manière, le taux de fibre insoluble est négativement influencé par la quantité d'agent alcalin utilisé ( $a_1 = -15,14$ ). La courbe d'iso réponse montre qu'une augmentation du KOH appliqué provoque une diminution de la fraction de fibre insoluble de l'extrudat. De cette manière, à concentration croissante, en KOH, en particulier au-delà de 6% du ratio KOH/CMD, une diminution significative de la fraction lignocellulosique est obtenue. Ce qui traduit ainsi une augmentation du taux de soluble dans le substrat prétraité. En parallèle, une diminution de la matière sèche de l'extrudat est

observée, qui traduit une filtration moins efficace par affaiblissement du bouchon dynamique lié à une destruction plus importante du substrat.

Quant à la composition de cette fraction lignocellulosique, des variations des taux de cellulose et d'hémicelluloses contenues dans les extrudats sont observées. L'analyse statistique montre que les deux réponses sont influencées principalement par le taux de KOH employé (significativité faible des coefficients). En ce qui concerne la cellulose, l'analyse statistique ( $R^2$  de 0,94) permet d'évaluer son comportement en fonction des deux paramètres. A faible ratio KOH/CMD sec (échantillons 5 et 6), la fraction de cellulose est en moyenne de 52%, soit plus de 5% de plus que dans la matière brute. Ceci est la conséquence de l'extraction des lignines et d'hémicelluloses conduisant à l'enrichissement du substrat prétraité en cellulose. Le bilan massique du rendement en cellulose obtenu en sortie d'extrudeur montre que des taux élevés en cellulose sont obtenus (au-delà de 80%). La cellulose est bien conservée lors du prétraitement, même si les conditions de KOH/CMD sec et température les plus élevées conduisent aux valeurs les plus faibles, traduisant sans doute un début de dégradation.

De la même manière, Paixao et al., (2016) ont observé un enrichissement en cellulose de la matière prétraitée lors du traitement de la bagasse de canne à sucre avec du KOH. Lors de cette étude, il a été montré que la concentration en KOH appliquée avait une forte influence sur le taux de cellulose obtenu. Le contenu en cellulose dans la bagasse de canne à sucre prétraitée atteint 80% de la matière sèche à 121°C en utilisant une solution de 10% de KOH.



**Figure 2.17** Photos des extrudats obtenus pour les essais menés dans le cadre du plan d'expérience avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, l'augmentation de la destructuration de la biomasse par la modification des conditions de prétraitement (température et ratio KOH/CMD sec) provoque l'augmentation de la viscosité de l'extrudat produit

L'étude de la courbe d'iso-réponse du taux d'hémicelluloses dans la fraction lignocellulosique (**Figure 2.16d**) indique que celui-ci décroît avec une augmentation du taux de KOH dès les plus basses températures testées. De cette manière, lors du prétraitement au KOH, les hémicelluloses dans la lignocellulose passent de 46% à 30% avec un ratio KOH/CMD sec de 10%. De manière à quantifier les pertes en hémicelluloses par rapport à la matière initiale, le taux d'hémicelluloses retirées (HR) a été calculé en utilisant le bilan massique (**Figure 2.16**). La courbe d'iso réponse obtenue pour cette réponse confirme une augmentation de la solubilisation des hémicelluloses par la charge en alcalin. A faible concentration en KOH, le taux de HR se trouve aux alentours de 20%, et s'élève au-delà de 40%, à plus haute concentration.

Les résultats obtenus par Paixao et al., (2016) pour les hémicelluloses de la bagasse de canne à sucre en utilisant des concentrations croissantes de KOH dans un autoclave à 121°C, montrent une solubilisation des hémicelluloses à une concentration en KOH de 5,5%. Dans les conditions étudiées, l'emploi de KOH dans le prétraitement alcalin provoque un enrichissement en hémicelluloses de la biomasse prétraité pour des concentrations des solutions appliquées entre 1% et 5,5%. Pour des

concentrations plus élevées, jusqu'à 10%, une solubilisation des hémicelluloses est observée, jusqu'à atteindre 13% de la matière sèche (pour 28,9% dans la biomasse brute). A faible taux de KOH, une augmentation de la température au-delà de 140°C permet de renforcer l'action de l'alcalin et conduit à une réduction de la teneur en hémicelluloses dans le substrat prétraité.

Le prétraitement alcalin est principalement reconnu pour sa capacité à solubiliser les lignines contenues dans la biomasse. Le taux de lignines dans la fraction insoluble de la biomasse prétraité ne semble pas varier significativement avec la modification des paramètres étudiés ; mais une légère diminution de cette fraction par rapport à celle de la matière brute est observable (de 7,1% à 6,6% de la fraction insoluble). Lors du calcul du bilan de masse pour l'extrudat, une perte des lignines contenues dans le coproduit de maïs doux a été observée. Ce taux de délignification (DL) présente une corrélation correcte avec l'équation polynomiale du deuxième degré ( $R^2$  de 0.947). Le facteur ayant un impact significatif et majeur sur cette réponse est le ratio KOH/CMD sec, néanmoins la température l'influence aussi dans une moindre mesure. Avec des conditions peu intenses le taux de lignines solubilisées est aux alentours de 20%. Lorsque le taux de KOH employé est élevé à 6%, on parvient à une délignification plus poussée qui atteint 30% des lignines de la biomasse brute. Les études de Paixao et al., 2016 et Liu et al., 2015, sur la bagasse de canne à sucre et la paille de blé respectivement, ont montré des taux de délignification maximums de 74% et 54%. Cependant pour atteindre des taux de délignification aussi élevés, des concentrations en KOH de 50% dans les deux cas ont été employées. Ces concentrations sont bien plus élevées que celles employées dans notre étude, qui ne dépassent pas 8,9%.

#### *2.4.1.3.2 Influence de la température et du ratio OH-/CMD sur l'hydrolyse enzymatique*

Afin de compléter l'étude de l'impact du prétraitement sur le substrat et d'évaluer son efficacité sur l'amélioration de l'accessibilité aux enzymes, l'hydrolysabilité de la matière traitée a été caractérisée. Les taux de sucres libérés et les rendements en sucres ont été mesurés. Les résultats obtenus pour des temps d'hydrolyse de 24h et 48h sont regroupés **Tableau 2.24** et **Tableau 2.25**

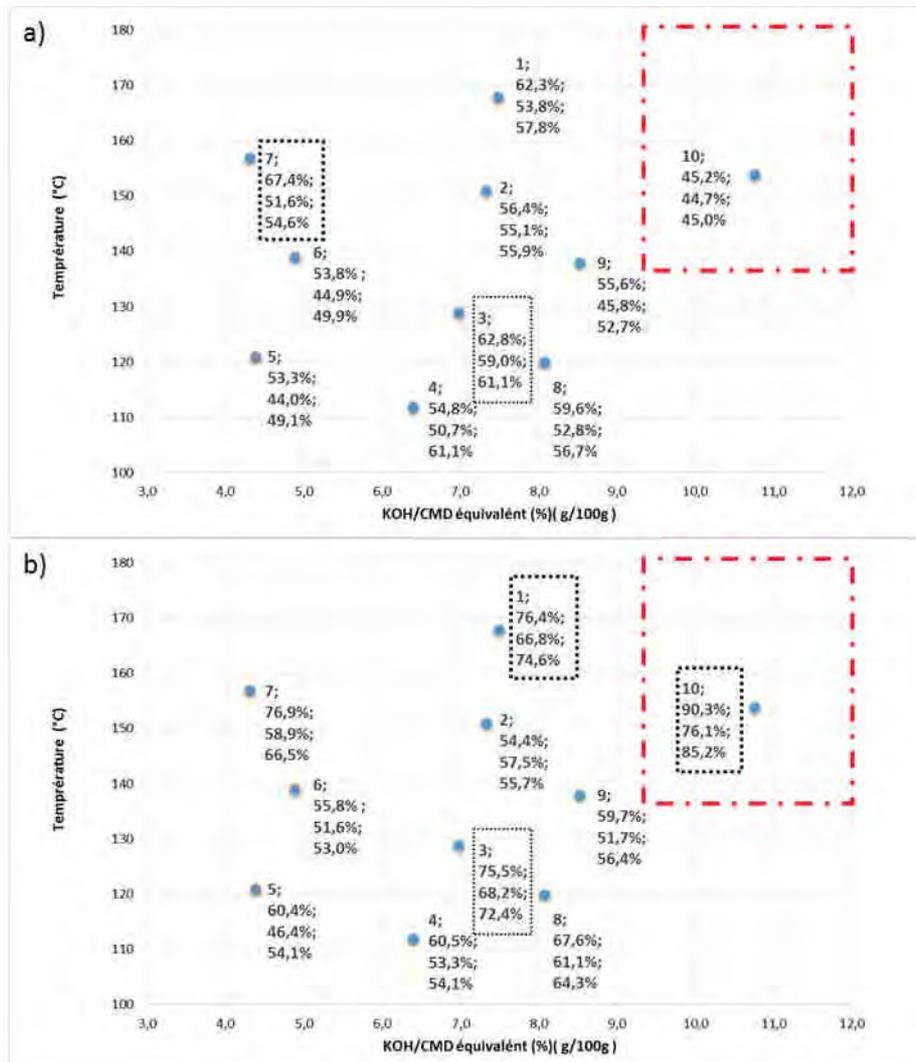
L'analyse statique du taux de sucres libérés n'a pas atteint une bonne corrélation avec l'équation polynomiale du second degré, raison pour laquelle elles n'ont pas été étudiées par surface de réponse et ont été reprises sous forme graphique (**Figure 2.18**). Il est probable que ces réponses soient influencées par des autres paramètres. Ainsi, dans le cas de l'essai 10, pour lequel la filtration n'était pas stable, les résultats d'hydrolyse enzymatique ont été ajoutés à titre indicatif. L'extrudat a été filtré avec une toile de maille afin de retirer l'excès de liquide et simuler une filtration correcte.

**Tableau 2.24** Hydrolysabilité des extrudats exprimée en taux de glucose libéré (GL), xylose libéré (XL) et sucres libérés (SL) après 24h et 48h d'hydrolyse enzymatique

Essai	T	Ratio OH/SC	KOH	EH 24h						EH 48h					
				GL	ET	XL	ET	SL	ET	GL	ET	XL	ET	SL	ET
				% (g glc/g de cellulose dans extrudat)		% (g xyl libéré /g d'hémicelluloses dans extrudat)		% (g xyl et glc libéré /g de cellulose et hémicelluloses dans extrudat)		% (g glc/g de cellulose dans extrudat)		% (g xyl libéré /g d'hémicelluloses dans extrudat)		% (g xyl et glc libéré /g de cellulose et hémicelluloses dans extrudat)	
°C mol/kg %															
1	168	1,33	7,5	62,3	5,7	53,8	0,2	57,8	1,9	76,4	0,4	66,8	1,9	74,6	1,7
2	151	1,31	7,3	56,4	1,7	55,1	1,3	55,9	1,6	54,4	1,4	57,5	2,5	55,7	1,8
3	129	1,24	7,0	62,8	2,6	59,0	1,9	61,1	2,3	75,5	1,4	68,2	3,4	72,4	2,3
4	112	1,14	6,4	54,8	1,4	50,7	0,0	53,1	0,8	60,5	0,8	53,3	1,6	57,4	1,1
5	121	0,78	4,4	53,3	2,9	44,0	1,7	49,1	2,4	60,4	0,9	46,4	0,2	54,1	0,4
6	139	0,87	4,9	53,8	0,0	44,9	1,1	49,9	0,5	55,8	2,9	51,6	3,1	53,0	3,5
7	157	0,77	4,3	67,4	0,1	51,6	2,3	54,6	0,5	76,9	2,4	58,9	3,8	66,5	2,9
8	120	1,44	8,1	59,6	4,0	52,8	0,1	56,7	1,0	67,6	0,1	61,1	0,9	64,3	1,4
9	138	1,52	8,5	55,6	0,3	45,8	0,9	52,7	2,0	59,7	0,3	51,7	0,5	56,4	0,3
10	154	1,92	10,8	45,2	9,9	44,7	9,1	45,0	9,6	90,3		76,1		85,2	

**Tableau 2.25** Hydrolysabilité des extrudats exprimée en rendement de glucose (RG), xylose (RX) et sucres (RS) après 24h et 48h d'hydrolyse enzymatique

Essai	T	OH- /CMD sec	KOH/CMD sec	EH 24h						EH 48h					
				RG	ET	RX	ET	RS	ET	RG	ET	RX	ET	RS	ET
				% (glc libéré/g de CMD sec)		% (xyl libéré/g de CMD sec)		% (glc + xyl libéré/g de CMD sec)		% (glc libéré/g de CMD sec)		% (xyl libéré/g de CMD sec)		% (glc + xyl libéré/g de CMD sec)	
°C mol/kg %															
1	168	1,33	7,5	25,5	2,3	14,2	0,1	38,9	1,3	31,3	0,2	17,6	0,5	50,2	1,1
2	151	1,31	7,3	23,2	0,7	15,0	0,4	38,2	1,1	22,3	0,6	15,7	0,7	38,0	1,2
3	129	1,24	7,0	23,8	1,0	16,8	1,1	40,6	1,5	28,6	0,5	17,2	2,1	44,1	7,1
4	112	1,14	6,4	20,8	0,5	14,2	0,0	35,0	0,5	23,0	0,3	14,9	0,4	37,9	0,8
5	121	0,78	4,4	21,7	0,8	14,1	0,4	36,4	1,2	24,0	0,3	15,1	0,0	39,1	0,3
6	139	0,87	4,9	22,4	0,0	14,8	0,3	37,2	0,4	22,4	0,0	14,8	0,3	37,2	0,4
7	157	0,77	4,3	26,4	0,0	13,8	0,6	37,7	0,4	30,1	0,9	15,8	1,0	45,9	2,0
8	120	1,44	8,1	20,6	1,4	13,2	0,0	33,7	0,6	23,4	0,0	15,2	0,2	38,3	0,8
9	138	1,52	8,5	19,6	0,1	11,3	0,2	31,2	0,3	21,0	0,1	12,8	0,1	33,8	0,2
10	154	1,92	10,8	4,6	1,0	2,6	0,5	7,2	1,5	10,7	2,1	5,3	1,3	16,0	3,4



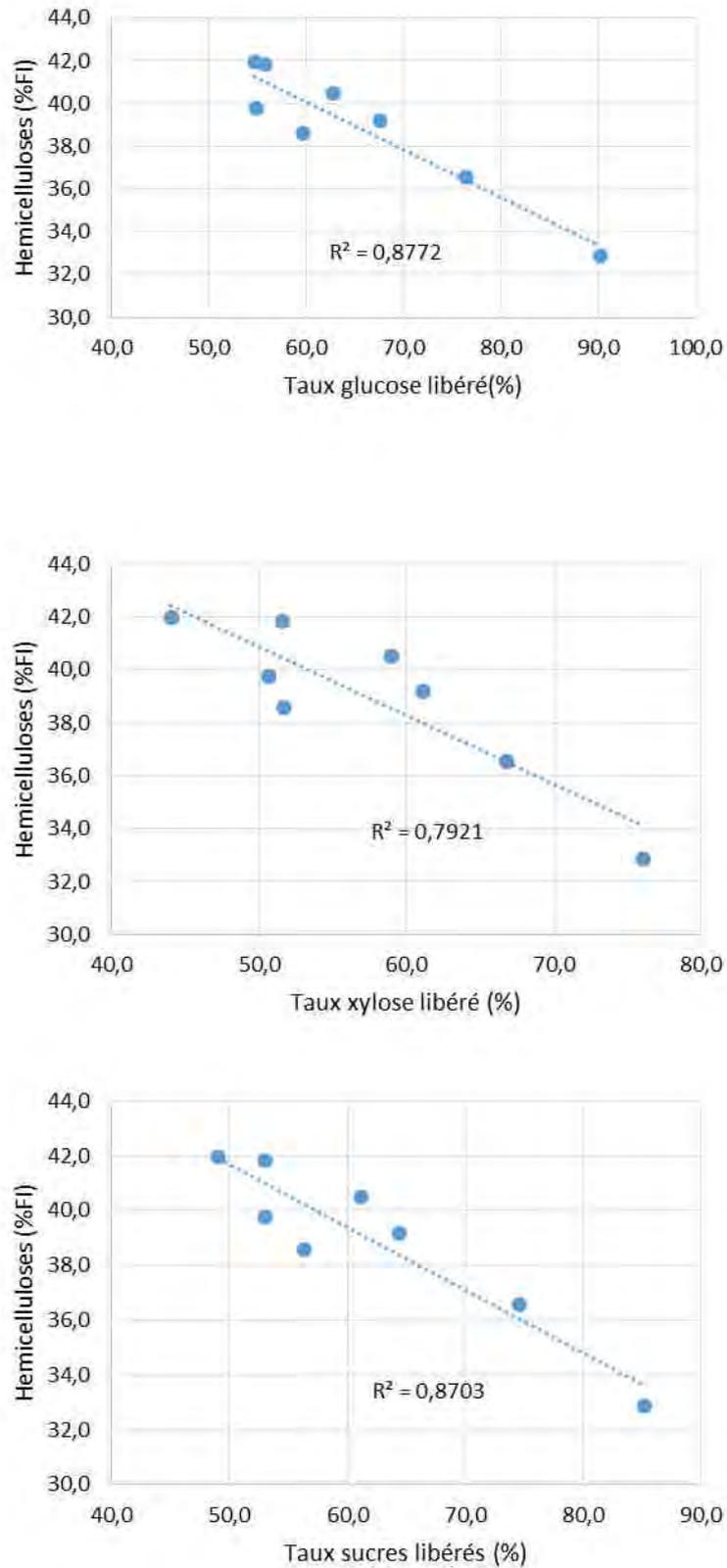
**Figure 2.18** Taux de sucres libérés après 24h (a) et 48h (b) d'hydrolyse enzymatique, chaque essai a été placé sur les graphiques en fonction de la température de fourreau mesurée et le ratio KOH/CMD sec, les valeurs en étiquette correspondent : au numéro de l'essai, le taux de GL, le taux XL et le taux de SL (glucose et xylose libérés) ; en rouge est délimitée la zone de filtration instable et les essais encadrés en pointillés correspondent aux les valeurs les plus élevées

A 24h d'hydrolyse enzymatique, les taux de sucres libérés pour les différents essais ne montrent de variations très facilement corrélables entre elles. A faible concentration en KOH et pour des températures limitées (110°C à 170°C), les valeurs de conversion en glucose sont proches de 54%. Lorsque le ratio KOH/CMD sec augmente à 7%, le taux de GL s'élève légèrement au-dessus de 55%. Même il peut atteindre des valeurs jusqu'à 67% pour un ratio KOH/CMD sec de 9,5% et une température de 160°C. Dans le cas du xylose, même s'il est difficile de définir une tendance, une

augmentation de la charge en alcalin et de la température permet d'atteindre des taux de 59% avec un ratio KOH/CMD sec de 7% et une température de 130°C.

Après 48h d'hydrolyse, les taux de conversion montrent des variations plus accentuées. Les taux de conversion des sucres obtenus à faible charge alcaline, augmentent faiblement après 48h d'hydrolyse, arrivant à 54%. L'augmentation de la charge en agent alcalin à faible température provoque une amélioration des taux de conversion à partir d'un ratio KOH/CMD sec de 8% (échantillon 8). La température semble avoir un impact sur les taux de conversion en sucres, notamment avec KOH/CMD sec proche de 6%, le taux de SL passant ainsi de 54% pour l'échantillon 4 à 74,6% pour l'échantillon 1 avec une augmentation de température proche de 60°C. Les valeurs de SL plus élevées ont été obtenues avec l'échantillon 10 pour lequel les conditions de prétraitement étaient les plus sévères. Cependant, dans les conditions étudiées, des tendances claires sur l'impact de la température ne sont pas obtenues. Toutefois, les taux de sucres libérés en glucose et xylose les plus élevés dans les conditions de filtration stables résultent des échantillons 3 et 1.

Le taux de GL et XL reflète l'accessibilité des enzymes à leurs substrats : la cellulose et les hémicelluloses. Dans la littérature, cette accessibilité est surtout affectée par le taux de lignines contenues dans les échantillons. Dans notre cas, les échantillons possèdent une fraction en lignines dans la fibre insoluble très similaire d'un échantillon à un autre, rendant l'analyse de l'influence de ce paramètre plus difficile. La proportion en hémicelluloses varie de façon plus importante entre les échantillons. L'expression des taux de sucres libérés en fonction du taux d'hémicelluloses contenus dans l'extrudat révèlent le lien entre les deux (**Figure 2.19**). Une diminution de la fraction hémicellulosique influence positivement le taux de conversion en glucose et xylose, confirmant un effet positif de la solubilisation des hémicelluloses sur la conversion des polysaccharides. Cependant, cette corrélation n'a pas pris en compte les résultats obtenus aux 2 et 7. Il est ainsi nécessaire de réaliser, des essais complémentaires afin de confirmer l'effet de la solubilisation des hémicelluloses sur l'accessibilité des enzymes à leur substrat.



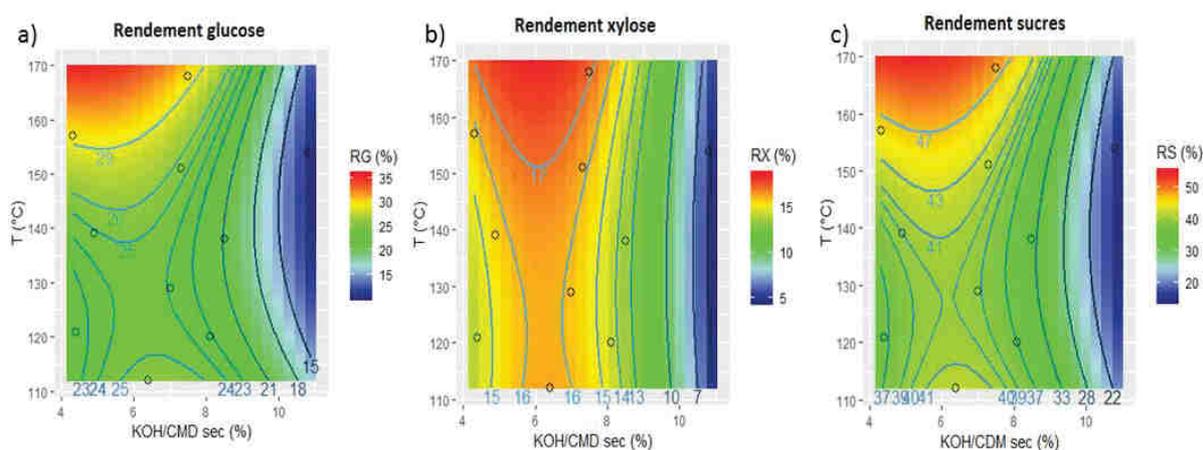
**Figure 2.19** Graphiques de corrélation entre le taux d’hémicelluloses dans la fibre insoluble des extrudats et le taux glucose libéré (a), xylose libéré (b) et sucres libérés (c) obtenus après 48h, pour cette corrélation les données des essais 2 et 7 ont pas été pris en compte

L'analyse statistique des rendements en glucose, xylose et en sucres au bout de 48h d'hydrolyse enzymatique des extrudats a été regroupée dans le **Tableau 2.26**. De manière globale, les rendements calculés après le prétraitement et l'hydrolyse des extrudats sont influencés par le taux d'alcalin appliqué. Le rendement en xylose est affecté plus faiblement par la température du prétraitement.

**Tableau 2.26** Analyse statistique de l'effet des paramètres KOH/CMD<sub>sec</sub> et T sur les rendements en glucose (RG), xylose (RX) et en sucres (RS) obtenus après 48h d'hydrolyse enzymatique

	RG		RX		RS	
ANOVA	102		1,50*		3,87*	
Ecart type	3,555		1,282		4,306	
R <sup>2</sup>	0,833		0,94		0,901	
R <sup>2</sup> A	0,625		0,864		0,77	
PRESS	341,533		43,682		649,27	
Degrés de liberté	4		4		4	
	C	S	C	S	C	S
a0	23,428	0,0446***	15,425	<0,01***	38,377	0,0137***
a1	-6,725	4,85*	-4,796	0,515**	-11,657	1,59*
a2	2,124	41,2	0,798	39,5	3,645	26,5
a11	-5,821	15,2	-5,575	0,933**	-11,484	4,5*
a22	4,138	30,3	0,836	54,4	5,936	23,4
a12	-4,006	42,2	-0,583	73,7	-4,027	50

C : coefficient ; S : Significativité



**Figure 2.20** Courbes d'iso réponse représentant les rendements de glucose (RG)(a), rendements en xylose (RX)(b) et rendements en sucres (RS) (c) après 48h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la température et du ratio KOH/CMD sec ; les points en blanc représentent les essais expérimentaux

Les courbes d'iso réponse tracées à partir de la corrélation avec l'équation du deuxième degré montrent l'influence des deux paramètres sur les rendements obtenus après 48h (**Figure 2.20**). Les rendements en glucose et xylose montrent des tendances similaires. D'une part, de faibles rendements sont observés pour des concentrations en potasse faibles (en dessous de 6%) et des concentrations élevées (au-dessus de 8%). En ce qui concerne le rendement en glucose, les valeurs plus élevées sont retrouvées pour des ratios KOH/CMD sec compris entre 4% et 8% et des températures supérieures à 150°C. Un maximum est atteint pour un ratio KOH/CMD sec de 8% et une température de 170°C, atteignant une valeur de 29%. Par ailleurs, les rendements du xylose les plus importants sont retrouvés pour des charges alcalines entre 4,5 et 8,0%, avec un maximum de 17% à 5% et 170°C. De cette manière, le rendement maximal en sucres est atteint pour un ratio KOH/CDM sec compris entre 4% et 8% et une température supérieure à 160°C.

Les plus faibles rendements en sucres obtenus à faible concentration en alcalin sont dus à un faible taux de conversion en sucres dans ces conditions. Le taux de conversion pour les échantillons 5 et 6 a montré une faible conversion des sucres dans ces conditions qui provenait certainement de la présence résiduelle d'une importante fraction en hémicelluloses. En outre, des faibles rendements sont aussi obtenus à haute concentration en KOH. La forte charge en alcalin provoque une déstructuration croissante de la biomasse et une solubilisation plus importante de sucre, sans oublier une diminution de l'efficacité de la filtration. De cette manière, une augmentation du ratio KOH/CMD sec implique une perte en solides, d'où une faible production en sucres fermentescibles, malgré une accessibilité accrue des enzymes à leur substrat.

#### **2.4.1.4 Conclusion**

L'étude de l'influence de la température et de l'apport en agent alcalin en utilisant KOH comme catalyseur a été menée pour des températures variant entre 110°C et 170°C et des ratios en KOH/CMD sec de 4 à 11%. Cette étude a montré que le principal impact sur la composition et les résultats de l'hydrolyse enzymatique est la charge en alcalin. L'effet de la température sur le prétraitement dans les conditions étudiées en utilisant la potasse est faible, mais permet tout de même de renforcer l'action de l'alcalin à faible concentration.

Il est à noter que le prétraitement produit des modifications de la composition et de la structure de la biomasse ayant un impact à la fois sur l'efficacité de la filtration, et sur l'hydrolyse enzymatique. Une diminution des hémicelluloses dans l'extrudat va influencer positivement l'accessibilité des enzymes à l'intérieur de la biomasse et la conversion de la cellulose et des hémicelluloses conservés. L'augmentation de l'accessibilité aux substrats des enzymes combinées à des faibles pertes en solides

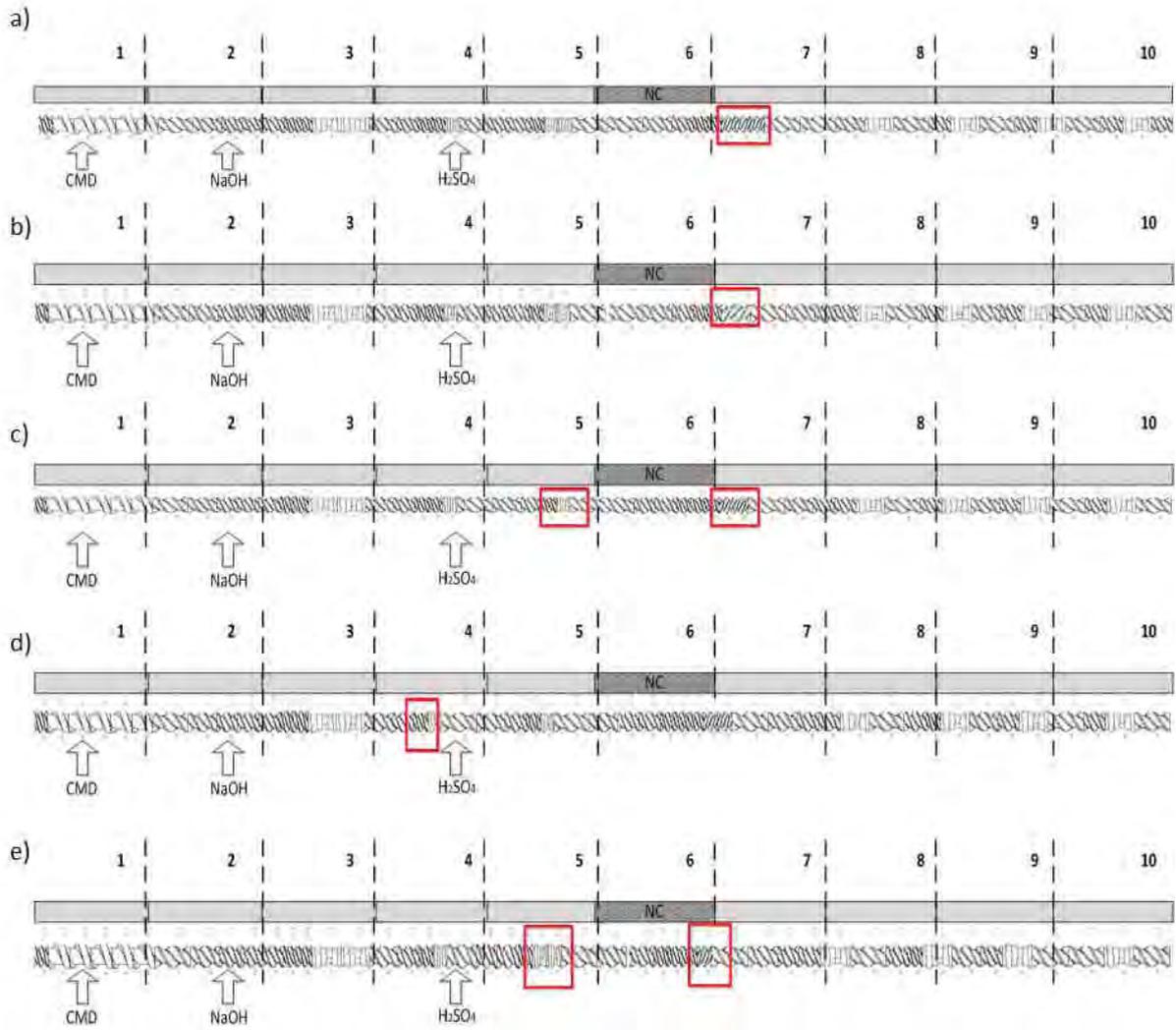
permettra d'obtenir des rendements maximaux en glucose et xylose. **A l'issue de cette étude, les conditions préconisées dans le cas de KOH sont : un ratio KOH/CMD sec compris entre 4 et 6% (0,7 et 1,4 mol/Kg de CMD sec) avec une température comprise entre 150 et 160°C.**

## 2.4.2 Etude du prétraitement avec NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 2.4.2.1 Mise en place des conditions d'extrusion et adaptation du profil de vis

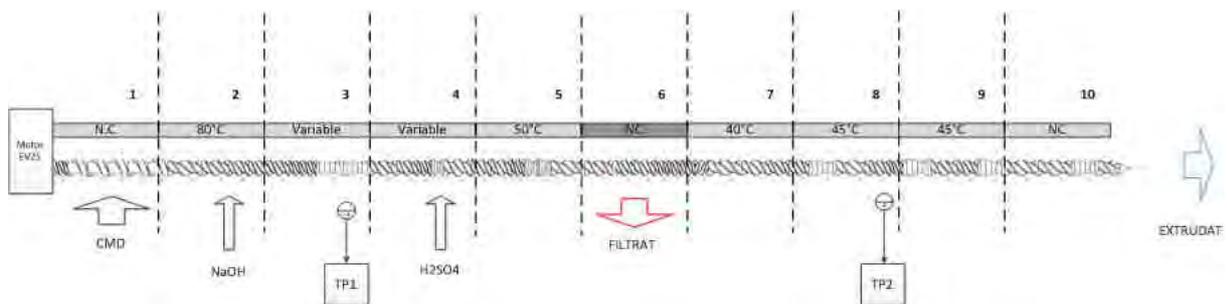
L'expérimentation est menée initialement de manière identique au cas de KOH si ce n'est que les éléments de mélange nécessaires à la bioextrusion ont été rajoutés sur le profil de vis dans les modules 7 à 10. Afin de compléter l'étude menée dans le cas de KOH, le domaine expérimental est élargie vers des températures basses descendant jusqu'à 50°C. Lors des essais préliminaires pour valider la stabilité du procédé sur le domaine expérimental visé (50°C à 170°C pour la température et 4% à 8% pour le ratio NaOH/CMD sec). Un essai mené à 90°C a conduit à des problèmes d'instabilité. Le niveau de destructuration plus faible obtenu dans les conditions appliquées a conduit à la formation d'un bouchon dynamique trop fort, ne permettant pas un écoulement de la matière suffisant le long du fourreau de l'extrudeur, et conduisant de ce fait au remplissage progressif des vis jusqu'au point d'entrée acide. L'accumulation de la matière derrière la pipe d'injection empêchait ainsi l'acide de pénétrer correctement dans l'extrudeur.

Pour remédier à ce problème, le profil a été modifié de manière à diminuer la pression au niveau du bouchon dynamique : les 3 contre-filets ont été remplacés par 2 contre-filets présentant un pas plus grand (**Figure 2.21a**). En utilisant ce profil, il n'a pas été possible d'obtenir une filtration stable. Un nouveau profil a été testé: les contre-filets ont été remplacés par des contre filets à pas plus serré et un des bilobes du module 5 a été remplacé par une vis de convoyage afin de diminuer la pression au niveau du module 5 et de l'augmenter au niveau du module 6 (**Figure 2.21c**). Avec ce profil, des fuites au niveau de l'entrée d'acide ont encore été détectées révélant un remplissage trop important dans la zone comprise entre les bilobes des zones 4 et 5. Le profil a été modifié de façon à agrandir cette zone en reculant le bilobe présent dans module 4, entraînant un décalage des contre-filets en début de module 7 (**Figure 2.21d**). Malgré, ces changements une fuite au niveau de l'entrée acide et des problèmes de filtration persistait. Un bilobe a alors été ajouté au niveau du module 5 pour limiter les risques de remonté de matière vers le module 4, et un des contrefilets a été supprimé dans le module 7 pour affaiblir le bouchon dynamique et faciliter le transfert de matière (**Figure 2.21e**). Ce profil nous a permis de diminuer la pression au niveau de l'entrée acide, d'obtenir une filtration stable et un extrudat neutralisé.



**Figure 2.21** Profils de vis testés pour la mise en place du prétraitement thermo-mécano-chimique dans l'extrudeur de type EV25 avec NaOH comme agent alcalin et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour la neutralisation

Le nouveau profil de vis est détaillé au niveau de la **Figure 2.22** et **Tableau 2.27**. Comme pour l'étude réalisée avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le coproduit de maïs doux est introduit au niveau du module 1, l'entrée de NaOH se situe à la fin du module 2 et l'entrée en acide se fait en fin de module 4. La filtration a lieu au niveau du module 6. Pour cette étude, la mise en place de sonde température été possible. La première sonde température est située au niveau du module 3, permettant un suivi de la température au niveau de la zone de prétraitement. La deuxième se trouve au niveau du module 7 ; cette sonde permet de vérifier la température au niveau du module d'injection des enzymes. Il faut rappeler que les enzymes sont des protéines qui à haute température sont susceptibles d'être dénaturées. D'autre part, les enzymes lignocellulolytiques employées dans cette thèse ont une température optimale de 50°C raison pour laquelle la température visée au niveau des modules 7 à 10 est de comprise entre 45 et 50°C. Cette température permettra une mise en activité des enzymes dans l'étape d'imprégnation. Le lot de matière employé pour cette étude est **le lot de CMD 3**.



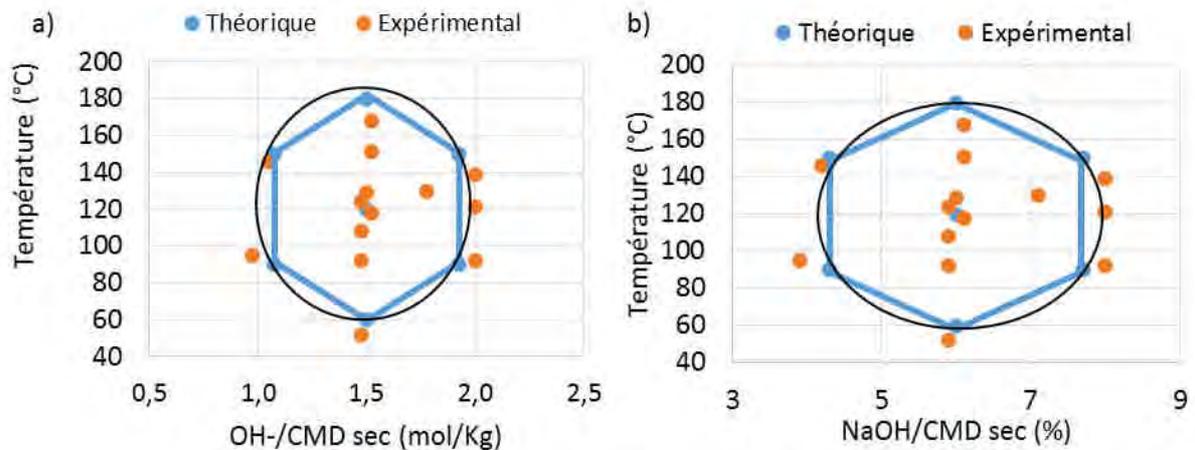
**Figure 2.22** Configuration et profil de vis utilisé pour l'étude de l'influence de la température et du ratio NaOH/CMD sec sur du coproduit de maïs doux ; TP : Sondes de température

**Tableau 2.27** Profil de vis détaillé employé pour essais de pour l'étude de l'influence de la température et du ratio NaOH/CMD sec sur du coproduit de maïs doux

Module	1						2			3						4						5						6					7					8			9			10								
T consigne (°C)	N.C.						100			Variable						Variable						100						50					50					50			50			50								
Type de vis	C2F	T1F	T1F	T1F	T1F	T1F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	BL2	BL2	C2F	C2F	C2F	C2F	BL2	C2F	C2F	C2F	C2F	BL2	BL2	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CF2	CF2	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F							
Longueur de vis ou nombre d'éléments restrictifs	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1,25	1,0	0,75	0,75	0,75	0,75	0,50	0,50	1,0	1,0	1,0	1,0	0,75	0,50	0,50	0,5	1,0	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	1,0	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,0	0,75	0,75
Pas de vis ou angle entre les éléments restrictifs	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1,25	10	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	90	90	1,0	1,0	0,75	0,5	0,5	90	10	0,75	0,75	0,5	90	90	10	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	10	10	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	10	0,75	0,75			

### 2.4.2.2 Etude de l'influence de la concentration en NaOH et température de prétraitement

Cette partie est présentée sous forme d'une publication, acceptée au journal *Industrial Crops and Products*, et a pour objectif de présenter les résultats obtenus sur l'optimisation du prétraitement alcalin en employant la soude et l'acide sulfurique comme agent neutralisant. L'étude a été réalisée en refaisant un plan d'expérience de Doehlert à deux facteurs, comme pour le cas de l'étude de l'optimisation du procédé avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (cf. **2.4.1 Etude du prétraitement avec KOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**). Cependant le domaine étudié est plus large. En effet, le domaine étudié a pour centre une température de matière de 120 °C et un ratio NaOH/CMD sec de 6% (soit un ratio OH-/CMD sec de 1,5mol/Kg) et des pas de variation de 60°C et 2% (**Figure 2.23**). Quatorze essais expérimentaux ont été réalisés dans le domaine expérimental, et leurs conditions de prétraitement sont détaillées dans le **Tableau 2.28**. Pour chaque essai, un filtrat et un extrudat ont été obtenus et caractérisés. Leur matière sèche et minérale ont été déterminés pour les deux fractions. Quant à l'extrudat, sa composition et hydrolysabilité ont été déterminées.



**Figure 2.23** Domaine expérimental de l'impact de la charge en alcalin et la température, la charge en alcalin est exprimé en OH-/CMD sec (a) et son équivalent en NaOH/CMD sec (b) ; le domaine expérimental est représenté par le cercle noir, les points théoriques en bleue et les points expérimentaux en rouge

**Tableau 2.28** Conditions de prétraitement des essais d'optimisation avec NaOH

Essai	NaOH/CMD sec %	OH-/CMD sec mol/Kg	Température °C
1	5,9	1,48	52
2	5,9	1,48	92
3	5,9	1,48	108
4	5,9	1,48	124
5	6,1	1,53	118
6	6	1,50	129
7	6,1	1,53	151
8	6,1	1,53	168
9	7,1	1,78	130
10	3,9	0,98	95
11	4,2	1,05	146
12	8	2,00	92
13	8	2,00	121
14	8	2,00	139

Title: Influence of temperature and soda concentration in a thermo-mechano-chemical pretreatment for bioethanol production from sweet corn co-products

---

Article accepté et publié par le journal Industrial Crops and Products

DOI : 10.1016/j.indcrop.2019.03.044

---

Monica Del Carmen Fong Lopez<sup>a\*</sup>, M. Rigal<sup>a</sup>, L. Rigal, G.Vilarem<sup>a</sup>, V. Vandebossche<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

### **Abstract**

A continuous process combining an alkaline pretreatment, neutralization and injection of enzymes within a twin screw extruder was previously implemented and demonstrate industrial potential. The present work focuses on the investigation of the effects of alkali and temperature during the alkaline pretreatment of sweet corn co-products (SCC) for the production of fermentable sugars with a lower chemical input. Study of NaOH/SCC and internal temperature was performed in ranges of 4 to 8% (w/w) and 50-170°C in a laboratory scale twin screw extruder. Analysis of carbohydrates and lignin of the pretreated biomass was performed and the filtration efficiency was also monitored through extrudate dry matter and filtrate mineral matter. The carbohydrate accessibility and process performances were studied by the enzymatic hydrolysis of the extrudate. Increasing temperature reinforces the effects of soda on solubilization of hemicelluloses, thus a hemicelluloses removal reach more than 50%. At optimal conditions, the cellulose-rich substrate after enzymatic hydrolysis achieve a glucose released of 70%, with glucose and xylose yields of 250g per 1Kg of dry SCC.

#### *2.4.2.2.1 Introduction*

The rise in global population necessities and upsurge in food and energy demands lead to the current environmental crisis. For instance, an increment in Green House Gas emissions forecasts temperature rises and climate perturbations (Schleussner et al., 2016). Therefore, to ensure sustainable food security, preservation of soil quality, the biodiversity and water reserves need to be addressed (Godfray et al., 2010). Additionally, with the increasing scarcity of fossil fuel, development of sustainable alternatives for transport energy are required (Leggett and Ball, 2012; Solomon, 2010). Transport energy demand solutions comprise bioethanol from renewable resources (Zabed et al., 2017). Bioethanol from lignocellulosic feedstocks (non-food raw material), such as agricultural residues, provide lower GHG emissions and fossil energy demand. However, its environmental impact significantly depends on land use conditions (Cherubini and Ulgiati, 2010)

Lignocellulosic bioethanol is obtained by a sequential unit operations i.e.: pretreatment, saccharification, fermentation, and distillation (Zabed et al., 2016). At present, overcoming the technical barriers at each unit operation dictates the economic feasibility of the production process. Concerning the pretreatment phase, optimization to increase enzymatic hydrolysis and fermentation efficiency while maintaining low operational costs are the major challenges (Chiaramonti et al., 2012). The biomass complexity in its physiochemical structure limits the enzymatic performances to deconstruct the carbohydrate matrix (Himmel et al., 2007). Thus, various physical, chemical, physicochemical and biological technologies have been applied to lignocellulose to enhance the enzymatic accessibility; (Alvira et al., 2010; Chiaramonti et al., 2012; Putro et al., 2016; Sun and Cheng, 2002). Currently, few technologies such as steam explosion, dilute acid, and alkali pretreatment have reached demonstration and commercialization phases, and their economic competitiveness are under study (IRENA, 2016).

Alkaline pretreatment technology has been extensively studied using different reagents, such as sodium hydroxide (Chen et al., 2013), ammonia (Prior and Day, 2008), potassium hydroxide (Sharma et al., 2013) and lime (Kaar and Holtzapfle, 2000). These alkali catalysts are known to disrupt the ester bonds between lignin and hemicelluloses, thereby providing partial or total lignin solubilization, resulting in the production of sugar oligomers and polymers. Furthermore, alkaline addition diminishes cellulose crystallinity by swelling which increases the internal surface area. In terms of process, temperature pretreatment presents advantages such as an affordable cost, high conservation of cellulosic material, low enzymatic production and fermentation inhibitors such as HMF and furfural (Kim et al., 2016; Modenbach, 2013; Rodrigues et al., 2016).

Therefore, by coalescing alkaline pretreatment with twin screw extrusion, a continuous, adaptable and a high solid efficient process can be achieved (Vandenbossche et al., 2014b). As a pretreatment, extrusion is characterized by shearing and pressure forces applied by the screw rotation, thus, leading to particle size reduction and fibrillation of the biomass (Zhang et al., 2011). The combined effects of extrusion with chemical pretreatment have been previously underlined: higher particle size reduction, solubilization of biomass components and sugar yields by enzymatic hydrolysis (Duque et al., 2017). In a recent study, Liu et al. 2018 compared alkaline pretreatment (AP) and alkaline twin-screw extrusion (ATSE) pretreatment on corn stover. According to the authors, mixing and chemical penetration in the extruder combined with the fibrillation enhance the lignin solubilization and therefore, the accessibility to cellulose and hemicelluloses of enzymes (Liu et al., 2018). Comparison of alkali and alkali extrusion on corn residues was also analyzed by Kathri et al., 2018. Results indicate a loss of hemicelluloses at the biomass surface with both alkaline pretreatments, but lower crystalline cellulose was detected in alkali-extruded biomass (Khatari et al., 2018)

Earlier studies have executed a continuous thermo-mechano-chemical-technology using twin screw extrusion (Vandenbossche et al., 2015) with successful pilot scale tests using six different biomass sources (Vandenbossche et al., 2016). This novel process includes different steps within the extruder, namely; alkaline pretreatment, neutralization, filtration, and enzymatic impregnation. Alkali pretreatment in the extruder prepares the biomass to have greater accessibility to the enzymes; whereas a neutralization phase acidifies the biomass and filtration step eliminates the yeast and enzymatic inhibitory compounds (salts and soluble molecules)(Deparis et al., 2017). The results from the previous studies demonstrate the efficacy of alkaline pretreatment and the potential of bioextrusion to reach a viable techno-economic process to produce bioethanol. Thereby, in the present work, the influence of temperature and alkaline concentration in reactive extrusion is analyzed using the design of experiments (DOE) with an objective to produce an accessible and cellulose-rich substrate with a lower chemical load. For this matter, the parameters determined by DOE were applied to extrusion using sweet-corn co-product.

#### *2.4.2.2.2 Materials and methods*

##### 2.4.2.2.2.1 Materials

#### **Feedstock**

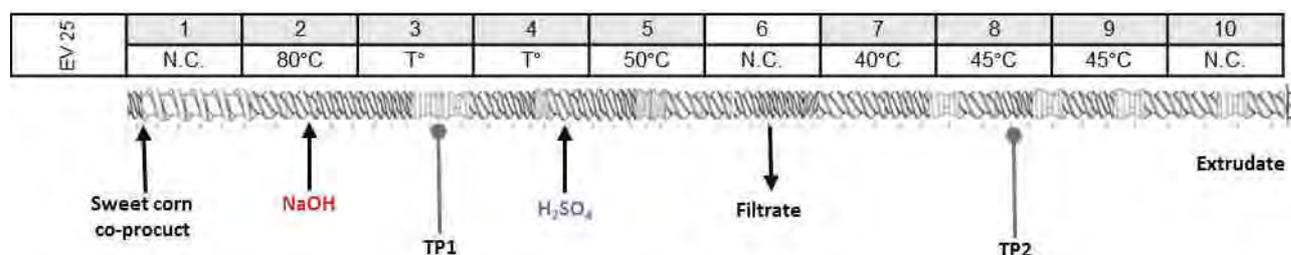
Dehydrated sweet corn (*Zea mays L. saccharata*) co-products (SCC) were obtained from industrial corn canneries and were provided by SARL Soupro+ (Castelmoron sur Lot, France). It was milled using a hammer mill fitted with a 6mm screen.

#### **Twin-screw Extrusion**

The extrusion process was performed using a twin-screw extruder (Evolum 25, Clestral, France), composed of 10 modules with a length of 100 mm each. The extruder is configured to combine three different processing steps: alkaline pretreatment, neutralization, and filtration of the biomass (**Figure 2.24**). The screw diameter is 25 mm. Four types of screws were used: a trapezoidal double-thread screw used for the feeding zone, conveying double-thread, screws bilobe paddle and reversed pitch double-thread screws used to produce transport, mixing, and shearing effects, respectively, along with the different zones of the process. A heating band thermoregulated modules and cooled by water circulation. Two internal temperature probes were introduced, in module 3 to monitor the temperature of alkali impregnation and module 8 to ensure matter temperature below 50°C. A filter section consisting of six hemispherical dishes with conical holes was used on module 6 to enable the filtrate to be collected. Feedstocks were fed into the extruder's first module using a feeder model number KCL-KT20 (K-tron, Clestral, France). Two piston pumps (DKM SUPER J PP 6.35, DKM SUPER K

PP 16, Cleutral, France) were used to inject, respectively, alkaline solutions of sodium hydroxide (NaOH) and acid solutions of sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

The conditions of extrusion were based on Vandenbossche et al., (2016) study at pilot scale. In this previous study, the pretreatment was conducted using sodium hydroxide at 10% (w/w) and barrel temperature of 100°C, the neutralization was carried out with phosphoric acid at 3.5 % (w/w) (Vandenbossche et al., 2016)). In this case, the screw rotation of the laboratory scale extruder was set at 300 rpm. The feeder screw discharged continuously the sweet corn coproduct at 1.8 Kg/h to obtain 1.6 Kg of dry sweet corn co-product per hour. Both pumps of reagents were fixed to maintain liquid solid ratios of 1.0 (Kg/Kg) in alkaline site and 4.2 (Kg/Kg) in acid introduction which correspond to a flow rate of 1.65kg/h for alkali solution and 5.80 Kg/h for sulfuric acid solution. The pH of pretreated biomass was controlled to ensure that biomass was neutralized. The pH of extrudate and filtrate aimed were 5 and 4 respectively. Both extrudate and filtrate samples were stored in plastic containers at -20°C.



**Figure 2.24** Schematic diagram of the modular barrel of EV25 twin-screw extruders; N.C.: Non-controlled; TP: Temperature probe

#### 2.4.2.2.2 Pretreatment and experimental design

To study the influence of NaOH and temperature in the pretreatment, the NaOH loading per g of dry matter of sweet corn co-product and the internal temperature monitored by the probe 1 (TP1) were evaluated. Pretreatment conditions were inspired by a 2 factors Dohelert experimental design. The experimental design consisted of a center at 120 °C and 6% variation steps of 60°C for temperature and 2% for NaOH/SCC. The responses analyzed were the composition of extrudate (insoluble fiber, celluloses, hemicelluloses and lignin), hemicelluloses removal, the filtration efficiency parameters (extrudate dry matter and filtrate dry matter) and the enzymatic hydrolysis (enzymatic conversion and sugar yield).

The statistical analyses were performed with NemrodW®. Once the data was collected, the responses were normalized, then fitted to the empirical equations (second order polynomial regression equations) for identification of main variables:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 \quad \text{Eq. 3.1}$$

Where the response is Y, the variables X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub> represent the normalized parameters, alkaline loading and the internal temperature measured, respectively. The responses are correlated to the center of the domain a<sub>0</sub>, linear (a<sub>1</sub> and a<sub>2</sub>), interactions (a<sub>12</sub>) and quadratic (a<sub>11</sub> and a<sub>22</sub>) coefficients. The coefficients a<sub>1</sub> and a<sub>2</sub> corresponding to the main effects of NaOH/SCC and internal temperature respectively.

#### 2.4.2.2.3 Analytical methods

##### Extrudate analysis

The French standard NF V 03-322 was used to determine moisture content and mineral content. An estimation of the three parietal constituents contained in the extrudates was performed using the ADF–NDF method from Van Soest and Vine (Soest et al., 1968). This method allows the quantification of insoluble fraction (IF), cellulose, hemicelluloses and lignin contained in the biomass. Insoluble fraction is obtained after neutral detergent wash and corresponds to the structural components in the fiber. All determinations were carried out in triplicate with a standard deviation < 1.5% for all measurements. Using these data and the extrudates flow rates, the mass balance of insoluble fiber, cellulose, hemicelluloses, and lignin were determined. The hemicellulose removal and the cellulose conservation rates were calculated by the following two equations (Eq. 3.2 and Eq. 3.3):

$$HR = ((H \text{ in initial SCC} - H \text{ in extrudate}))/ (H \text{ in initial SCC}) \times 100 \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$CY = ((C \text{ in extrudate})/ (C \text{ in initial SCC} )) \times 100 \quad \text{Eq. 3.3}$$

Where H stands for hemicelluloses and C to cellulose. The hemicelluloses and cellulose are expressed in mass.

### Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis of extrudates were conducted at a consistency of 5% (W/W) on 0.5 g (extrudate dry matter) at 50°C using a shaken hot-water bath and 25mL glass Pyrex tubes for 48h. Citrate-phosphate buffer (pH=5) was added to maintain the pH at 5, and 0.02% sodium azide was used in the mixture to avoid microbial contamination. The commercial enzymatic cocktails used for the study were provided by Novozyme (Franklinton, USA), Cellic Ctec 2 and hemicellulases NS22002. The protein content of each cocktail was determined by the Lowry method (Biorad Protein assay kit), and cellulase activity was determined using the method reported by Ghose (Ghose, 2009). The protein content of Cellic Ctec 2 was 254.9 g/L and cellulase activity of 123.3 FPU/mL, and NS22002 protein content was 36.9 g/L. The Cellic Ctec 2 loading for saccharification assays was 15 FPU/g of the dry extrudate and was complemented NS22002 at 10% (protein basis). After 48h of hydrolysis, the samples were diluted in 50mL total volume. Afterwards, they were centrifuged and the supernatant was filtered through a 0.22µm membrane. The hydrolysate was analyzed with the HPIC (High-performance ionic chromatography, Dionex, France) system using a Carbopac PA1 column. The efficiency of enzymes to release glucose and xylose was studied by glucose and xylose conversion rates, whereas the sugar yields evaluated the performance of the process to produce both monosaccharides using Eq. 3.4 & Eq. 3.5:

$$GR = m \text{ glucose released (corrected with blanks)} / m C \text{ in extrudate} * 1.1 * 100 \quad \text{Eq. 3.4}$$

$$XR = m \text{ xylose released (corrected with blanks)} / m H \text{ in extrudate} * 1.1 * 100 \quad \text{Eq. 3.5}$$

Where m is the mass of carbohydrate in grams, the cellulose (C) and hemicelluloses (H) in extrudate correspond to each carbohydrate contained in 0.5g of dry extrudate. The 1.1 value corresponds to the conversion factor of glucan into glucose (180/162) and hemicelluloses into xylose and arabinose (150/132). SCC hemicelluloses are composed of 85% of xylan and 15% arabinose (data not shown). Therefore, in this study, XR only accounts as an indicator of the xylose produced.

$$\text{Glucose Yield} = m \text{ glucose released (corrected with blanks)} / m \text{ dry raw SCC} * 100 \quad \text{Eq. 3.6}$$

$$\text{Xylose Yield} = m \text{ xylose released (corrected with blanks)} / m \text{ dry raw SCC} * 100 \quad \text{Eq. 3.7}$$

Where  $m$  is the mass in grams. The mass of dry SCC was calculated as the ratio  $(Q_{\text{ext}}/Q_{\text{SCC}})*0.5$ , where  $Q_{\text{ext}}$  is the flow rate of oven-dry extrudate and  $Q_{\text{SCC}}$  is the flow rate of dry matter of sweet corn coproduct. Data presented in this paper are the averages of the results from triplicate experiments with standard deviation lower than 5%.

#### 2.4.2.2.3 Results and discussion

##### 2.4.2.2.3.1 Raw biomass analysis

The corn husk and cob form the sweet corn co-product. After harvesting, it was dried by the supplier to a final dry matter of 89.9%. Characteristics in terms of composition and enzymatic hydrolysis are presented in **Tableau 2.29**. SCC has a large lignocellulosic fraction, 75.2% formed by a large portion of carbohydrates, hemicelluloses (39%) and cellulose (31%) and a low lignin amount (5%). Soluble sugars content was analyzed. Glucose concentration was 0.013g/g of biomass and traces of xylose, arabinose and galactose were detected at minor concentrations. Due to its high carbohydrate content and low lignin content, SCC is a promising substrate to produce bioethanol by enzymatic hydrolysis and co-fermentation. In terms of availability, canned industry in south-west of France reported production capacity between 280,000 - 390,000 t/year of SCC. As it is currently used for animal feed, it is considered as a waste, hence, a high potential feedstock for upcycling with economic viability.

**Tableau 2.29** Raw sweet corn characteristics: solid content, composition and enzymatic hydrolysis results

	Units	Values		S.D.
<b>Composition</b>				
<i>Dry matter</i>	%	89.5	±	0.1
<i>Minerals</i>	% DM	5.9	±	0.3
<i>Protein</i>	% DM	8.5	±	0.22
<i>Insoluble fiber</i>	%DM	75.2	±	0.5
<i>Cellulose</i>	%IF (%DM)	40.8 (31.0)	±	0.8
<i>Hemicelluloses</i>	%IF (%DM)	53.1 (39.0)	±	
<i>Lignin</i>	%IF (%DM)	6.1 (5.0)	±	
<b>Enzymatic hydrolysis at 48h</b>				
<i>GR</i>	% (g/g cellulose in SCC)	28.7	±	1.7
<i>XR</i>	% (g/g of hemicelluloses in SCC)	25.2	±	1.6
<i>GY</i>	% (g/g of dry SCC)	9.8	±	0.6
<i>XY</i>	% (g/g of dry SCC)	11.6	±	0.7

Note: DM: Dry Matter IF: Insoluble Fiber EH: Enzymatic Hydrolysis; GR: Glucose Released; XR: Xylose released; GY: Glucose Yield; XY: Xylose Yield

### 2.4.2.2.3.2 Effect of soda loading and temperature

#### Extrudate and filtrate composition

According to Alvira et al. 2010 (Alvira et al., 2010), as bioethanol is potentially produced by co-fermentation of C5 and C6 sugars, an economically viable pretreatment is based on the cellulose and hemicelluloses recovery. Simultaneously, minimizing the effect of hemicelluloses and lignin as a barrier for saccharification. Alkaline pretreatments are generally known for the disruption of lignin structure and solvation of acetic groups in hemicelluloses, thus, producing solubilization of part of the lignocellulose (Kim et al., 2016). The analysis of extrudate composition at different conditions was conducted to monitor the effect of NaOH/SCC and temperature on the biomass carbohydrate content and lignin removal. The results are summarized in the **Tableau 2.30** and the statistical analysis in **Tableau 2.31** and **Figure 2.25**. Additionally, filtration efficiency is ensured by the mechanical force applied by the reverse screw in module 7, forming a dynamic plug that pressures the biomass. As the pretreatment deconstructs the biomass, the viscosity of the matter rises, affecting the dynamic plug stability and efficiency filtration. As filtration is less effective, moisture content in extrudate is higher and the mineral matter of filtrate is lower. Consequently, dry matter of both outputs were monitored, and results are shown in and iso-response curves (**Figure 2.26**).

**Tableau 2.30** Extrudate composition, mass balance indicators and filtrate mineral matter for all samples analyzed

Sample	NaOH/SCC	Temperature	Extrudate composition					Mass balance indicators			Filtrate
			Solid content	IF	C	H	L	Q ext	CY	HR	MM
Units	% (w/w)	°C	%DM	%DM	%IF (%DM)	%IF (%DM)	%IF (%DM)	Kg/h	%	%	%DM
1	5.9	52	45.0	79.8	43.1 (34.4)	54.3 (40.5)	2.6 (4.9)	1.33	83.9	16.8	32.8
2	5.9	92	40.0	79.0	43.4 (34.2)	53.9 (40.3)	2.8 (4.4)	1.34	83.3	16.8	33.0
3	5.9	108	39.0	78.0	45.2 (35.3)	51.2 (37.9)	3.5 (4.8)	1.31	87.3	10.2	32.7
4	5.9	124	38.0	76.0	46.4 (35.5)	50.0 (36.7)	3.5 (4.3)	1.27	87.4	11.2	33.0
5	6.1	118	38.2	78.5	48.1 (37.7)	47.7 (37.0)	4.2 (3.7)	1.27	89.4	17.3	31.1
6	6.0	129	38.0	76.5	49.7 (38.0)	45.3 (34.7)	4.9 (3.2)	1.27	87.5	22.8	31.2
7	6.1	151	36.5	75.7	50.7 (35.3)	45.0 (34.3)	4.3 (3.6)	1.19	94.8	23.2	33.6
8	6.1	168	36.3	73.3	48.2 (38.4)	47.3 (34.1)	4.4 (3.2)	1.22	95.4	28.9	33.0
9	7.1	130	36.4	74.0	50.5 (37.4)	46.3 (34.3)	3.2 (2.4)	1.20	90.0	34.7	36.4
10	3.9	95	45.1	81.6	43.1 (35.2)	52.2 (42.6)	4.7 (3.8)	1.21	85.2	31.6	31.5
11	4.2	146	42.4	77.7	43.0 (33.5)	52.6 (40.9)	4.3 (3.4)	1.27	88.6	33.6	31.9
12	8.0	92	38.3	72.8	49.4 (36.0)	45.7 (33.3)	4.9 (3.5)	1.22	86.4	34.7	39.2
13	8.0	121	33.8	68.1	51.8 (35.2)	44.2 (30.1)	4.0 (2.7)	1.18	81.9	42.8	37.8
14	8.0	139	32.9	67.8	50.7 (34.4)	44.9 (33.6)	4.3 (2.9)	1.14	77.0	44.2	37.0

**Note:** SCC: Sweet Corn Co-product; IF: Insoluble Fiber; DM: Dry Matter; Qext: Extrudate flow; CY: Cellulose Yield; HR: Hemicelluloses Removal; MM: Mineral Matter

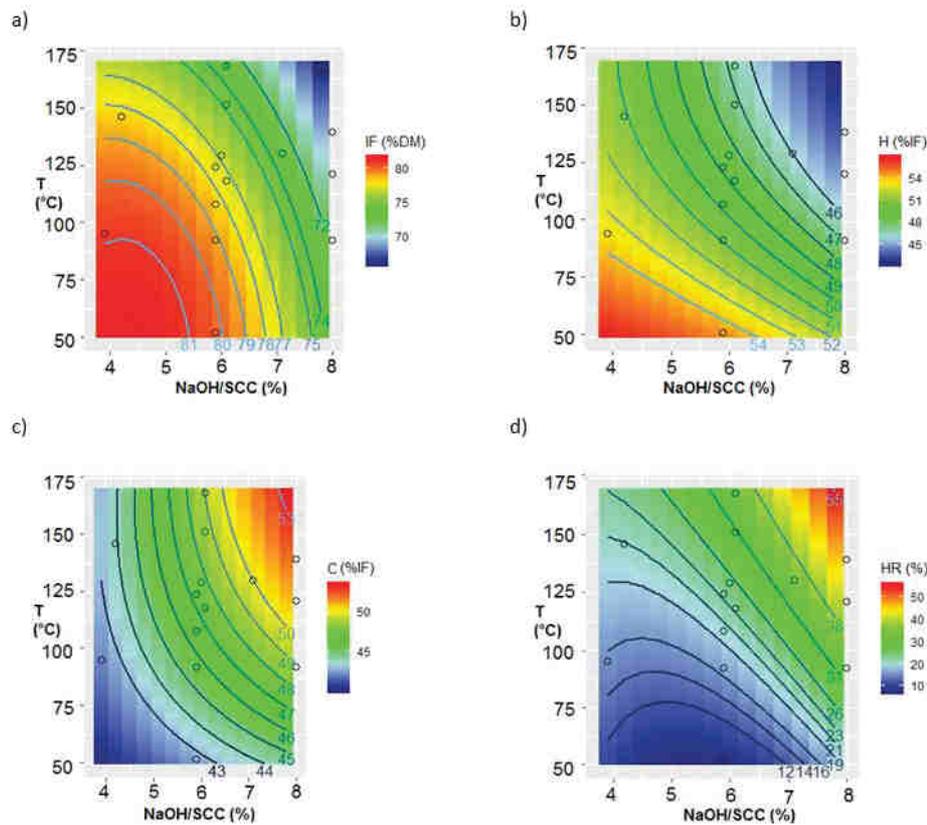
The  $R^2$  of the equation expresses the statistical accuracy of the fit. A significant  $R^2$  means that the predicted values are close to the measured values. Statistical analysis performed on the extrudate composition demonstrates that the fit was accurate for IF, whereas for cellulose and hemicelluloses,  $R^2$  of the models implies that only tendencies can be deduced.

Concerning lignin content in the extrudate,  $R^2$  was not significant to be analyzed by the equation. For the IF, cellulose, and hemicelluloses, NaOH had a more significant impact than temperature as reflected by the  $p$ -values of their coefficients. Iso response curves of IF (**Figure 2.25 (a)**) display a strong influence of both parameters to diminish its value. When low NaOH and temperature are applied, IF fraction is essential. To disrupt the IF at 4% soda loading, a temperature higher than 150°C is necessary. Nevertheless, the increasing soda loading disrupts IF, and its effect is reinforced by temperature.

**Tableau 2.31** Statistical analysis of the effects of studied parameters on extrudate composition and mass balance indicators

	Insoluble Fiber		Hemicelluloses		Cellulose		HR	
$R^2$	0.952		0.786		0.84		0.920	
Terms	Estimated	$p$ value	Estimated	$p$ value	Estimated	$p$ value	Estimated	$p$ value
$a_0$	78.04	< 0.01 ***	49.50	< 0.01 ***	46.81	< 0.01 ***	21.175	<0.01***
$a_1$	-4.96	< 0.01 ***	-3.65	0.740 **	3.75	0.157 **	11.193	0.00477**
$a_{11}$	-2.63	0.514 **	-0.51	70.7	-0.22	83.1	6.987	2.16*
$a_2$	-3.29	0.0709 ***	-3.75	1.23 *	2.99	1.10 *	12.517	0.00541***
$a_{22}$	-1.31	21.2	1.21	52.6	-1.02	49.2	-0.220	2.40*
$a_{12}$	-0.89	52.8	-1.07	68.6	1.50	47.0	6.170	24.2

\* indicate that term has a significant effect at 95% confidence interval



**Figure 2.25** Iso response curves indicating Insoluble Fiber (%DM) (a), hemicelluloses fraction (%IF) (b), cellulose fraction (%) (c) and hemicelluloses removal rate (%) (d) as function of the temperature (T) and NaOH/SCC ratio. The circles represent the experimental results

Isoresponse curves of H content (**Figure 2.25** et **Figure 2.26(b)**) reveals a similar trend than IF, high H fraction is obtained with mild conditions and an increase in temperature and NaOH/SCC triggered its reduction. With temperatures below 90°C, soda effect is only observed from 6%. As the temperature reaches 90°C, NaOH solubilization of hemicelluloses is visible. Variations of H content due to NaOH are less noticeable at temperatures of 100-125°C, with values between 45-52%. Values below 45% are attained with a temperature exceeding 125°C and NaOH/SCC beyond 6%. To conclude, the temperature must surpass 50°C to attain hemicelluloses solubilization. In the same way as IF, effect by soda is enhanced by an increase in temperature. Hence, reduction of IF is attributed to the partial solubilization of the hemicelluloses.

Considering the mass balance of the process, hemicelluloses removal (HR) rate from initial SCC was also analyzed (**Figure 2.25 (d)**). The HR is linear to the soda loading and the temperature attained. In the studied conditions, to reach more than 20% HR, both effects must be combined. To cite an instance, solubilization of hemicelluloses at 8% needs 50°C to reach 20% removal, however, at 4% it needs more than 150°C. Temperature needs to be attained to observe the NaOH effect on

hemicelluloses. Although solubilization has occurred, a significant part of this fraction remained at the end of the process, considering that a minimum of 60% of the initial H is conserved, offering the possibility of improving ethanol yield by saccharification and co-fermentation of xylan.

The heterogeneous and amorphous structure of hemicelluloses makes it more susceptible to degradation by pretreatments than cellulose (Saha, 2003). By way of illustration, xylan losses were observed with Alkaline Twin Screw Extrusion pretreatment (ATSE process) by Liu et al. 2013 (Liu et al., 2013). During this process, biomass goes through a twin-screw extruder with 4 zones of compression as the alkaline solution is added. As soda loading was increased from 0.06 to 0.1 g/g of oven dry corn stover, the xylan loss raised from 21.7 to 39.3 %. Moreover, the study of soda concentration and barrel temperature using the present alkali-extrusion process by Duque et al. 2013 on barley straw, pinpointed that at the highest NaOH loading (i.e. 7.5% NaOH/g dry barley straw), hemicellulosic fraction breaks down. Nevertheless, the impact of temperature in the conditions tested was not significant (Duque et al., 2013). Effect of the temperature on the hemicelluloses recovery after alkaline pretreatment of corn stover was reported by Chen et al. 2013 (Chen et al., 2013). The statistical analysis, presented for the recovery of hemicelluloses, indicated that temperature plays a key role in the solubilization of hemicelluloses. Pretreatments in literature are difficult to compare due to the variations on the substrate, extrusion profiles and process conditions. However, it is generally agreed that the hemicellulosic structure is disrupted by soda attack, while the temperature effect depends on the conditions applied.

Variation of the studied parameters demonstrates that hemicellulosic disruption by NaOH needs temperature, whereas lignin removal was detected at all conditions. At the mildest conditions (Sample 10), lignin concentration was already diminished to 4.7% instead of 6.1% in raw SCC. Nevertheless, delignification behavior is not regulated by the studied parameters, as the fitting had a low  $R^2$ , implying more parameters could be involved in lignin breakdown. Lignin restructuring after hydrothermal pretreatment on corn stem (Donohoe et al., 2008) and steam explosion on poplar holocellulose (Sannigrahi et al., 2011) were studied. The results exhibit that lignin fraction can undergo physico-chemical modifications such as re-condensation and formation of pseudo-lignin with carbohydrates occasioned by the temperature and pressure employed. In extrusion pretreatment, the effect of reverse screw elements on corncobs produced lignin re-distribution at the fiber surface, thus, blocking pores (Zheng et al., 2015). In the three studies mentioned, droplets of lignin on the biomass surface were observed by SEM. Although, in the present work lignin restructuring was not analyzed, these examples illustrate its sensibility for pretreatment conditions.

In regard to the cellulose contained in IF (**Figure 2.25 (c)**), the statistical analysis shows that its increase is attributed to the combined effect of soda and temperature, as expressed by the linear coefficients  $a_1$  and  $a_2$  of this response. Iso-response curves analysis indicate that NaOH loading lower than 6% at temperatures below 125°C does not lead to modification of C content in the extrudate. C fraction increases as the NaOH loading is intensified and can attain more than 60% with temperatures higher than 130°C and NaOH/SCC higher than 6%. The response surface of C content is inverted from the one of H content. The gain of the cellulose portion in the extrudate results from the extraction of hemicelluloses and lignin. Recovering a substrate with a higher cellulose portion than the untreated SCC proves to be an advantage for future saccharification step.

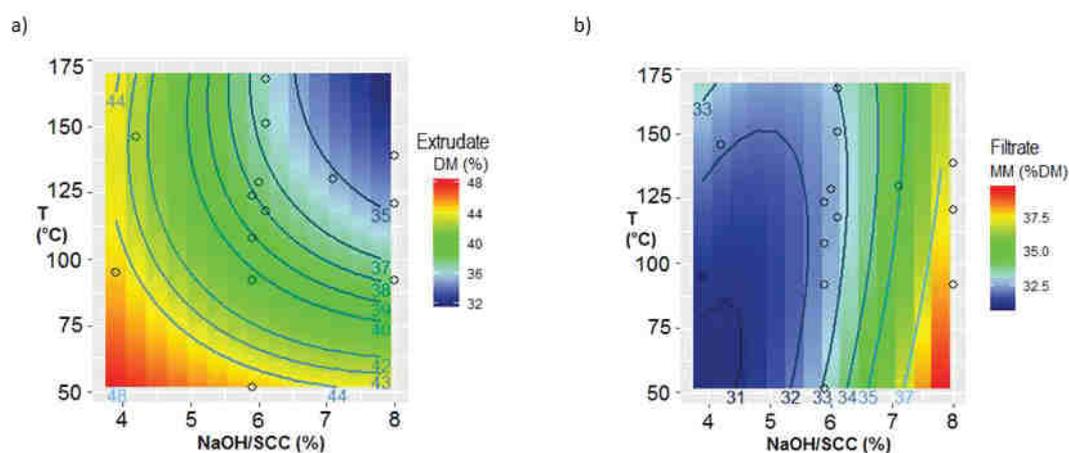
Additionally, cellulose yield (CY) was calculated from the mass balance of the process. A maximum yield of cellulose obtained for soda loadings between 5-7% NaOH/SCC and temperature of 75-125°C, reached 90%. Globally, alkali extrusion preserves cellulose through the overall process and variations in different conditions were not significant. However, CY could be affected by the temperature, since at NaOH loading higher than 8% and temperature >150°C, the CY decreased. The results obtained imply the possibility of cellulose solubilization or charred as a result of the excessive severity of the pretreatment, as encountered by Silva et al., 2013 when using extrusion with ionic liquid at 180°C (Silva et al., 2013).

As mentioned earlier, a statistical analysis of the extrudate and filtrate mineral was carried out to study the impact of parameters on filtration efficiency (**Figure 2.26**). The fit is accurate for both responses (**Tableau 2.32**). Concerning extrudate dry matter, the coefficients exhibit that extrudate solid content is modified by the combination of alkali and temperature. It is negatively impacted by increasing reagent input and temperature augmentation (**Figure 2.26 (a)**). The liquid /solid ratio of base and acid were kept constant in the extrusion process. Therefore, variations of the solid content of the extrudate reflect the filtration performance. Study of IF and H content in extrudate demonstrates the partial lignocellulose solubilization takes place during pretreatment, thereby leading to variations of the biomass viscosity and the dynamic plug stability. Along with the produced IF solubilization, the dynamic plug is softened leading to a decrease in extrudate dry matter.

**Tableau 2.32** Statistical analysis of the effect of the normalized parameters (temperature and NaOH/SCC) on extrudate and filtrate mineral matter

R <sup>2</sup>	Extrudate Dry matter		Filtrate mineral matter	
	Estimated	p value	Estimated	p value
a <sub>0</sub>	38.76	< 0.01 ***	32.55	<0.01***
a <sub>1</sub>	-4.06	< 0.01 ***	3.46	0.0128***
a <sub>11</sub>	1.01	2.83 *	2.31	0.686**
a <sub>2</sub>	-4.11	< 0.01 ***	-0.33	70.5
a <sub>22</sub>	1.94	0.646 **	0.55	56.0
a <sub>12</sub>	-2.07	2.36 *	-1.32	32

\* indicates that the term has a significant effect at 95% confidence interval


**Figure 2.26** Iso response curves indicating solid dry matter (DM) of extrudate (a) and mineral matter (MM) of the filtrate (b) as function of the temperature (T) and the NaOH/SCC ratio, the circles represent the experimental results

With respect to the filtrate mineral matter (**Figure 2.26 (b)**), the coefficients indicate that the soda loading mainly modifies it. As chemicals are added, the content of salts in the filtrate augments, however, as the temperature is increased at high chemical input, there is a decrease of the mineral matter, implying a lower filtration efficiency. Application of this process needs to take into consideration limitations due to the filtration step since higher IF breakdown leads to a weaker dynamic plug. Images of extrudates and filtrates (**Tableau 2.32** et **Figure 2.26**) depict the impact of the filtration efficiency in extrudate moisture content and solid content of the filtrate. It must be mentioned that filtration is critical in order to ensure the elimination of salts that inhibit fermentation

step (Casey et al., 2013; Deparis et al., 2017), and to obtain high extrudate dry matter to easily manage L/S ratios in further phases.

### Enzymatic hydrolysis

The enzyme efficiency to access polysaccharides for saccharification was mainly evaluated through glucose (GR) and xylose released (XR). These equations express the ability of enzymes to access and produce glucose and xylose from the extrudate. Simultaneously, the process was assessed by the analysis of the glucose and xylose yields. The results from enzymatic hydrolysis after 48h were summarized in **Tableau 2.33**. Both sugar released and yields were studied statistically. Analysis of the XR was conducted by analysis of coefficients and the iso response curves (**Tableau 2.34** and **Figure 2.27**), however GR was studied through the values in Table 5 due to poor fitting with the model. General observation showed that the combination of twin-screw extrusion and thermo-chemical action upgraded the action of enzymes on SCC as GC and XC values of extrudates vary from 64% to 81% and 46% to 81.7% which is an improvement of by 2 to 3 times compared to untreated biomass (**Tableau 2.29**). This is associated to the mechanical and chemical actions. The conveying and kneading screws have proven to increase porosity of biomass and reduce of particle size, promoting the enzyme action (Zheng et al., 2015). Using alkaline extrusion, pretreated biomass exposes higher amount of non-crystalline cellulose at the surface, producing higher conversion of carbohydrates than sole alkali pretreated biomass (Khatri et al., 2018).

**Tableau 2.33** Enzymatic hydrolysis indicators. Results are based on glucose and xylose released after 48h, and express the enzymatic performances to digest extrudate (GR and XR) and yield of the overall process (GY and XY)

Sample	NaOH/SCC	Temperature	Enzymatic hydrolysis			
			GR	XR	GY	XY
units	% (w/w)	°C	% g/g cellulose in extrudate	% g/g of hemicelluloses in extrudate	% g/g of dry SCC	% g/g of dry SCC
1	5.9	52	67.7	50.9	23.6	19.4
2	5.9	92	68.6	64.7	23.8	22.5
3	5.9	108	70.3	73.0	24.7	26.7
4	5.9	124	76.0	81.1	25.6	25.8
5	6.1	118	71.3	82.3	25.0	27.6
6	6.0	129	68.3	78.0	25.2	24.5
7	6.1	151	72.4	73.0	23.8	21.0
8	6.1	168	64.4	69.0	23.0	20.4
9	7.1	130	81.0	79.1	27.4	22.8
10	3.9	95	66.8	59.9	21.6	21.8
11	4.2	146	67.5	66.6	23.0	21.9
12	8.0	92	74.9	88.3	24.8	25.5
13	8.0	121	70.9	89.3	22.0	22.4
14	8.0	139	75.4	82.0	22.2	22.2

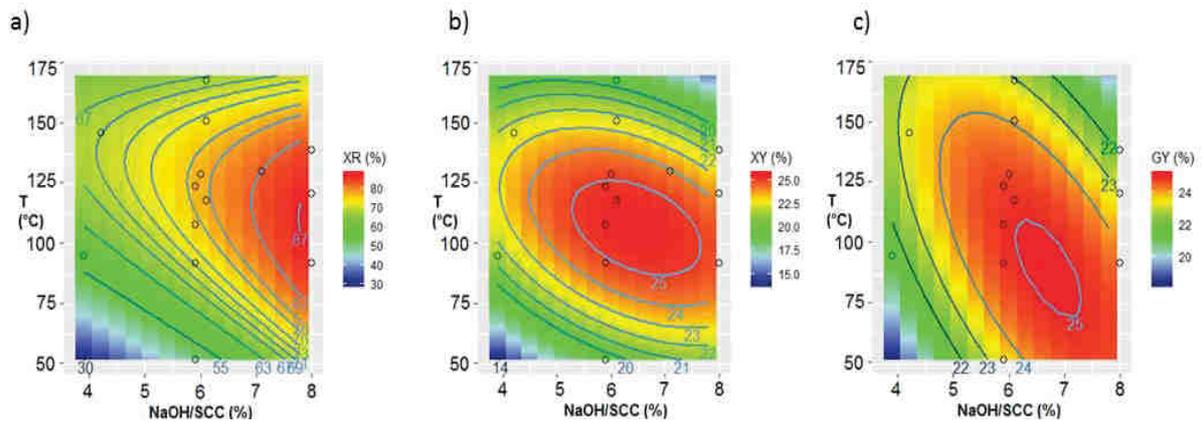
Note: SCC: Sweet Corn Coproduct; GR: Glucose Released; XR: Xylose Released; GY: Glucose Yield; XY: Xylose Yield

Increasing the NaOH load clearly leads to a modification of the structure of the lignocellulosic fraction in the extruded matter, primarily by the solvation of hemicelluloses and lignin. Since both components act as a physical barrier enveloping cellulose, its elimination from the substrate can lead to a higher production of glucose by EH. Mild pretreatment conditions lead to less deconstruction of lignocellulose, thus lower GC values (Samples 1, 2, 10 and 11). Nonetheless, higher GR can be reached by increasing solubilization of hemicelluloses, either by NaOH increment (Samples 12-14) or by temperature augmentation (Samples 3-5).

Concerning XR, according to the coefficients, the temperature and the NaOH/SCC impact its modification on the conditions studied (**Figure 2.27a**). The linear coefficients  $a_1$  and  $a_2$  are positive, meaning beneficial action of these parameters. However, quadratic coefficient for temperature is negative, putting into evidence a negative influence. As observed in the response surface, the best XR is reached with a combination of NaOH loading beyond 7% and temperature rise  $\sim 125^\circ\text{C}$ . Although, for all soda concentration, an increase in temperature has an adverse effect. These observations may be attributed to the lignin restructuring. As previously discussed, lignin is profoundly affected by temperature and can undergo structural modifications. In the previous study by Zheng et al. 2015, the action of reverse screw induces high local temperatures that reached transition temperature of lignin. Although it was fixed at  $75^\circ\text{C}$ , the outcome was lignin blocking pores and lower enzyme digestibility. Lignin content is not modified (around 4%) but could undergo structural changes due to temperature and pressure applied by the reverse screw placed after the filtration module (beginning of module 7), provoking the inactivation of enzymatic digestion.

**Tableau 2.34** Statistical analysis of the effect of studied parameters on enzymatic hydrolysis

	XR		XY		GY	
$R^2$	0.923		0.762		0.821	
Terms	Estimated	<i>p</i> value	Estimated	<i>p</i> value	Estimated	<i>p</i> value
$a_0$	76.14	<0.01***	25.64	<0.01***	24.95	<0.01***
$a_1$	12.041	0.019***	0.84	32.3	0.61	12.2
$a_{11}$	0.245	92	0.04	96.8	-0.26	53.6
$a_2$	8.205	0.461**	-2.01	8.3	-2.04	0.238**
$a_{22}$	-16.789	0.0926***	-6.12	0.328**	-1.56	4.02*
$a_{12}$	-8.587	9.8	-2.45	24.6	-2.33	3.01*



**Figure 2.27:** Iso response curves indicating xylose released rate (%) (% of xylose released/g of hemicelluloses in extrudate)(a), xylose yield (XY)(% g of xylose released/g of dry SCC)(b) and glucose yield (GY)(% g of glucose released/g of dry SCC)(c). The circles represent the experimental results

Promoting enzyme efficiency to degrade carbohydrates through optimization of the pretreatment conditions is not the sole objective of this study. High production of fermentable sugar and the deduction of chemicals applied during the pretreatment is crucial to achieving a techno-economical viable process. Consequently, the evaluation of glucose (GY) and xylose yields (XY) is essential to determine the performance of the processes in the studied conditions. Fit for both responses did not reach significant values, in contrast, tendencies can be deduced from statistical analysis (**Tableau 2.34**). Iso-response curves of XY (**Figure 2.27 (b)**) reveal that for all alkali charges, temperatures between 90 and 125°C allow the increment of XY beyond 60%. However, temperature and soda can also have adverse effects, for temperature above 150°C and soda loading higher than 7%. Bringing into comparison the iso-response curves of XR and XY, it shows that XY is not correlated only with enzymatic accessibility. Although high XC is reached with augmented hemicelluloses solubilization, the XY is affected when the hemicelluloses yield decreased by the effect of soda and temperature.

Concerning GY (**Figure 2.27 (c)**), temperature boost GY between 6-7.5% NaOH/SCC, this effect is also limited for temperatures above 125°C. This condition is consistent with high values of CY (~ 90%) and GC (>70%). These results illustrate the necessity to associate not only high enzymatic digestibility but significant cellulose conservation to achieve high GY. In addition, GY is negatively impacted by temperatures higher than 150°C and NaOH/SCC ratios beyond 8%, likely due to cellulose deterioration as mentioned earlier. Furthermore, analysis of both iso-response curves allows to conclude that the conditions for optimal glucose and xylose yields are at 6-6.5% NaOH/dry SCC and internal temperature from 90°C to 125°C, where GY and XY could reach 25% each (500g of sugars per 1 Kg of dry SCC).

#### 2.4.2.2.4 Conclusions

In the present study, the effects of pretreatment alkali loading and temperature in the extruder were investigated. The results underline that several phenomena may be involved in biomass structural modification and the enzymatic hydrolysis. Extrudate insoluble fiber, cellulose and hemicelluloses are mainly affected by the employment of catalyst, and temperature enhances its effect. Under the test conditions, the higher NaOH charge and temperature resulted in the disintegration of hemicelluloses, producing a cellulose-rich substrate. Likewise, it improves the enzymes accessibility resulting from physical barrier elimination. Despite the positive effect of temperature and NaOH/SCC on enzymatic hydrolysis, there are limitations since an adverse effect is observed for cellulose conservation, xylose conversion, and sugar yields. Overall, sugar yield can be improved while decreasing the chemical content in the process through heat.

In terms of process, since there are not competitive uses for this material, the valorization of SCC into bioethanol is economically interesting for the local market. Considering future steps (impregnation of enzymes, saccharification, and fermentation), the optimal conditions set by this work were at 6-7% NaOH/dry SCC with an internal temperature between 110 - 130°C. Compared with conditions employed in earlier works, this study provides a decrease of 3% of sodium hydroxide and 2% of acid inputs. This contributes to the reduction of the pretreatment cost and its environmental impact. Advantageously, in these conditions, filtration is stable and solid content of extrudate is around 36%. This promotes working at high consistency for the future steps and the elimination of inhibitory molecules. The future work will focus on improved enzymatic impregnation for saccharification and co-fermentation at high consistency with additional feasibility studies at pilot scale.

#### **Acknowledgements**

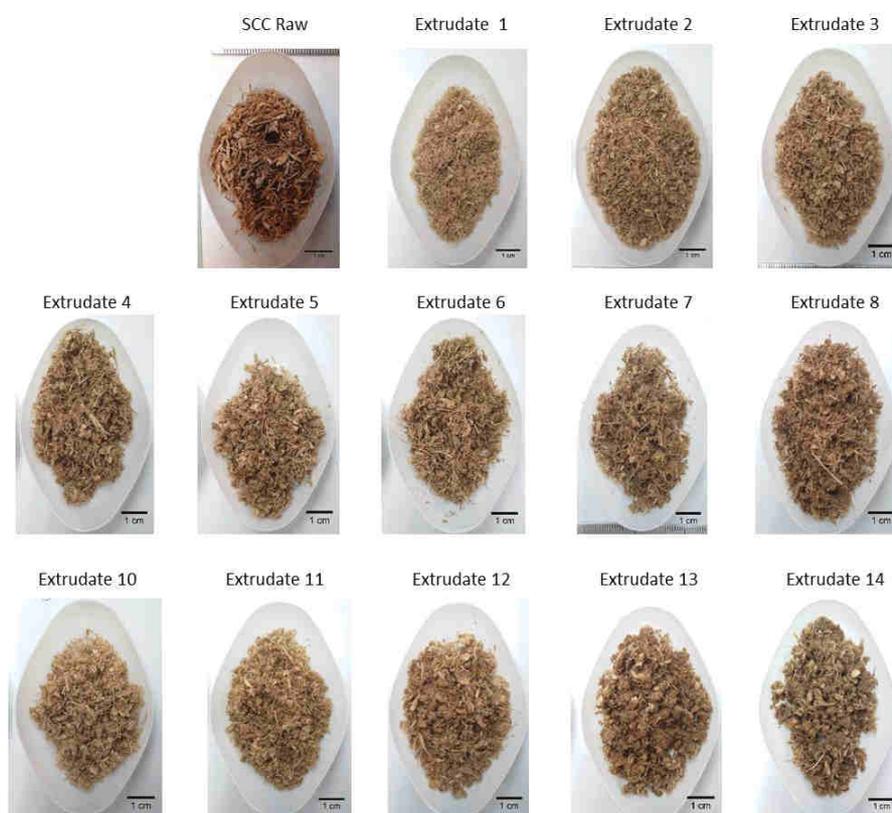
This work has been funded by the European Community (Horizon 2020) under Grant agreement reference n°654365 (BABET-REAL 5 PROJECT)). The authors would like to thank Dr. Franck Cerruti for the statistical analysis assistance.

2.4.2.2.5 Supplemental files

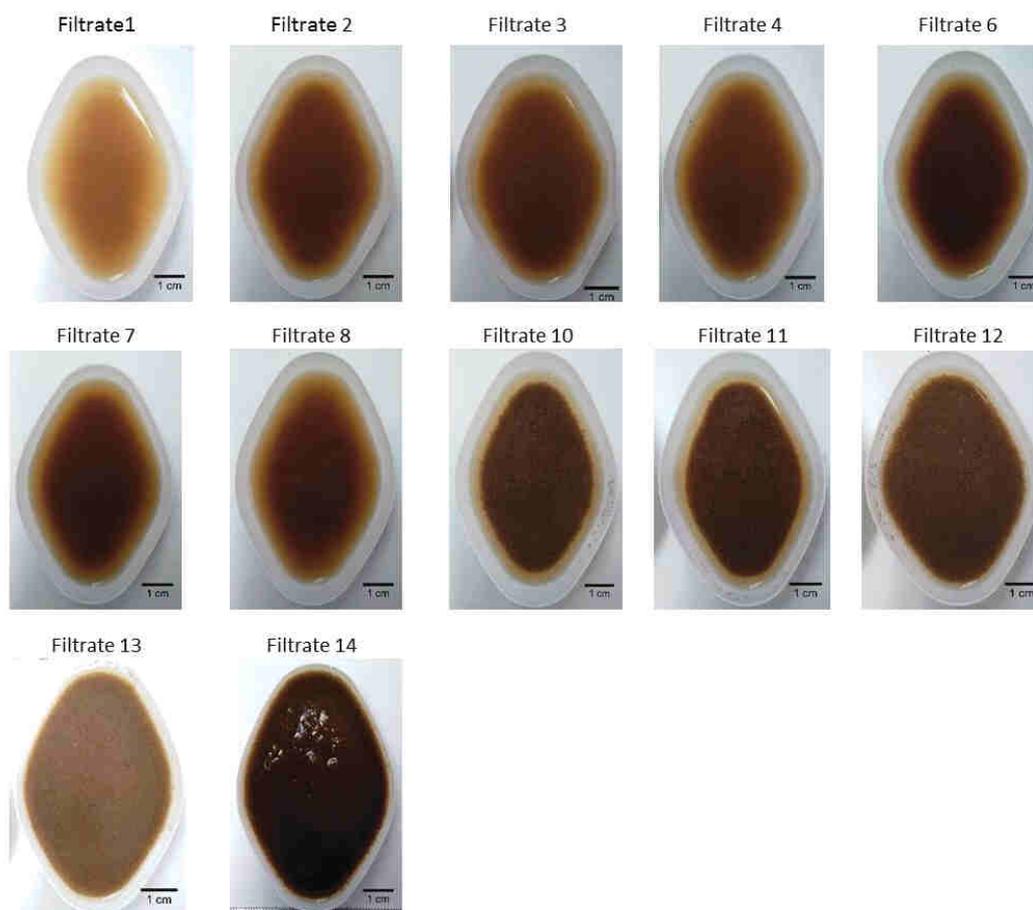
**Tableau S2 1** : Normalized data using Z-score method

Experimental design				
Sample	NaOH/SCC	T	X1	X2
units	% (w/w)	°C		
1	5.9%	52	-0.0500	-1.0000
2	5.9%	92	-0.0500	-0.3103
3	5.9%	108	-0.0500	-0.0345
4	5.9%	124	-0.0500	0.2414
5	6.1%	118	0.0500	0.1379
6	6.0%	129	0.0000	0.3276
7	6.1%	151	0.0500	0.7069
8	6.1%	168	0.0500	1.0000
9	7.1%	130	0.5500	0.3448
10	3.9%	95	-1.0500	-0.2586
11	4.2%	146	-0.9000	0.6207
12	8.0%	92	1.0000	-0.3103
13	8.0%	121	1.0000	0.1897
14	8.0%	139	1.0000	0.5000

SCC : Sweet Corn Coproducts ; T : Temperature probe 1



**Figure S2 1** Photos of untreated biomass and extrudates obtained with part conditions evaluated in the present work



**Figure S2 2** Photos of filtrates obtained with part of the conditions evaluated in the present work

#### 2.4.2.2.6 Conclusion

L'étude de l'influence de la température et de l'apport en agent alcalin en utilisant NaOH comme catalyseur a été menée pour des températures variant entre 50°C et 170°C et des ratios en NaOH/CMD sec de 4 à 8% (1 à 2 mol de OH-/Kg de CMD sec). Cette étude a montré que le principal impact sur la composition de l'extrudat et les résultats de l'hydrolyse enzymatique est la charge en alcalin ; néanmoins la température renforce l'effet de la soude, notamment sur la solubilisation des hémicelluloses. Ainsi, une charge élevée en soude combinée avec une température élevée dans l'extrudeur conduisent à une forte destructuration de la matière. Cet effet peut être bénéfique pour atteindre une conversion et un rendement élevé en glucose et xylose, toutefois dans le cadre de certaines conditions peuvent être néfastes pour la conservation en cellulose et la filtration. Les résultats de cette étude fixe des conditions optimales dans le cas de NaOH à : **un ratio NaOH/CMD sec compris entre 6% et 7% (1,5 et 1,75 mol de OH-/Kg de CMD sec) avec une température entre 110°C et 130°C.**

### 2.4.3 Eléments de conclusion sur l'orientation du choix de l'alcalin

#### 2.4.3.1 Comparaison des résultats expérimentaux obtenus avec KOH et NaOH

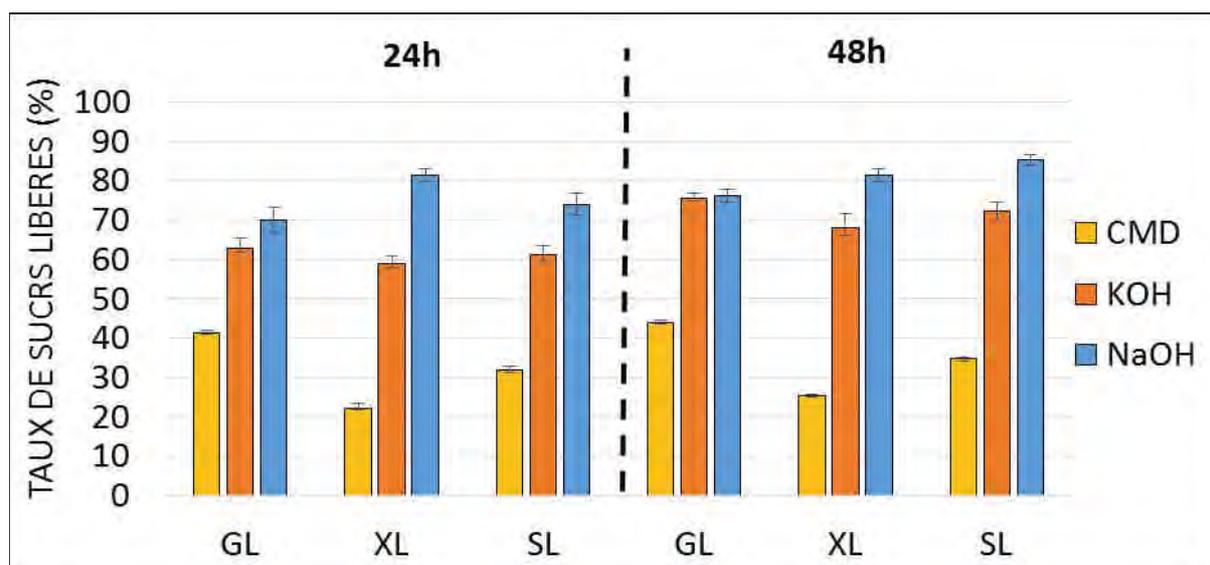
Les études réalisées grâce aux plans d'expérience sur l'influence de la température et de la charge en alcalin sur le prétraitement du coproduit de maïs doux, en utilisant KOH et NaOH, ont permis de mettre en évidence des comportements différents en fonction du choix de l'alcalin. Dans un premier temps dans le cas de KOH, plusieurs réponses ont été corrélées à une équation polynomiale du deuxième degré, dont notamment le taux de délignification (DL). Dans le cas de NaOH, le taux de délignification n'a pas été corrélé de façon satisfaisante aux deux facteurs par une équation de ce type. De même, l'analyse statistique des coefficients de l'équation, a montré qu'en employant la potasse, la charge en alcalin est le paramètre ayant une influence principale. Tandis qu'en appliquant de l'hydroxyde de sodium, les réponses étudiées sont impactées plus lourdement par l'effet de la température.

Pour confirmer ces différences l'effet des deux agents alcalins sur le prétraitement du CMD, la comparaison de deux essais, un avec KOH et un avec NaOH, avec le CMD lot 2 comme matière initiale a été réalisée. Ces essais ont été réalisés avec une température de prétraitement (température matière) de 129°C et une charge en OH<sup>-</sup>/CMD voisin de 1,25 mol/Kg, dans le but de faire une comparaison dans des conditions équivalentes. Egalement, pour chacun de ces essais un échantillon du filtrat a été envoyé à SOLAGRO (partenaire du projet) afin d'évaluer leur potentiel méthanogène. La composition des extrudats ainsi que les résultats du bilan massique pour l'extrudat ont été regroupés sur le **Tableau 2.35** et les résultats d'hydrolysabilité sont indiqués sur la **Figure 2.28**.

**Tableau 2.35** Composition et indicateurs du bilan massique pour les extrudats et caractéristiques des filtrats obtenus par traitement avec NaOH et KOH du lot de CMD 2

Conditions				Composition extrudat					Indicateurs bilan massique pour l'extrudat					Filtrat	
Base	T	Base/CMD sec	OH- /CMD sec	MS	FI	C	H	L	MS	CC	DL	HC	HR	MS	MM
	°C	%	mol/Kg	%	%MS	% FI (%MS)	% FI (%MS)	% IF (%MS)	Kg	%	%	%	%	%	% MS
KOH	129	6,7	1,2	38,9	80,6	54,0 (43,6)	40,5 (32,7)	6,6 (4,4)	79,1	<b>92,1</b>	<b>26,7</b>	<b>70,9</b>	<b>29,1</b>	10,0	29,4
NaOH	128	5,7	1,4	45,8	78,4	58,9 (46,2)	32,0 (25,0)	9,1 (7,2)	70,6	<b>94,8</b>	<b>68,1</b>	<b>49,6</b>	<b>50,4</b>	10,8	25,5

T : Température matière ; MS : Matière Sèche ; FI : Fraction Insoluble ; C : Cellulose ; H : Hémicelluloses ; L : Lignine ; CC : Cellulose conservée ; DL : Taux de délignification ; HC : Hémicelluloses conservées ; HR : Hémicelluloses Retirées ; MM : Matière minérale



**Figure 2.28** Taux de sucres libérés (a) et rendement (b) après 24h et 48h d'hydrolyse enzymatique en conditions d'hydrolysabilité pour les extrudats par prétraitement avec KOH et NaOH ; GL : Glucose Libéré ; XL : Xylose Libéré ; SL : Sucres libérés

Dans des conditions de température et de concentration en alcalin équivalentes, une destructuration plus importante du substrat est observée avec NaOH. Elle se traduit par une extraction d'hémicelluloses et des lignines beaucoup plus importantes (presque doublé dans le cas des hémicelluloses et triplé dans le cas des lignines). La cellulose est, par contre, peu impactée avec une conservation de 95% par rapport à la matière initiale. Le taux de sucres libérés obtenus à 24h et 48h, en utilisant NaOH est plus élevé que celui obtenu avec KOH, avec un écart de 13% entre les valeurs pour chaque temps de prélèvement. D'un côté, le taux de glucose libéré augmente quasiment de la même manière quel que soit l'agent alcalin employé. Cependant, un taux de xylose libéré de 80% en employant NaOH, est atteint au bout de 24h, tandis qu'avec KOH la production de xylose est plus lente et atteint 70% après 48h d'hydrolyse.

Des études comparatives de prétraitement entre NaOH et KOH ont été réalisées par de nombreuses auteurs (Dong Yang et al., 2009; Ong et al., 2010; Rodrigues et al., 2016; Sharma et al., 2013; Xu et al., 2010b). La plupart des essais comparatifs entre KOH et NaOH évoqués ont été réalisés dans des conditions identiques, notamment en employant une quantité égale en alcalin sur une base massique. Cependant, comme le montre le **Tableau 2.1**, les deux bases possèdent des concentrations différentes en OH (42,5% pour NaOH et 30,4% pour KOH). De plus, les différentes conditions de prétraitement employées rendent difficile la comparaison de l'effet de NaOH et KOH sur la biomasse lignocellulosique. Néanmoins, la molarité des bases a été prise en compte par la publication de Rodriguez et al. (2016). Les essais de prétraitement alcalin avec KOH, NaOH et  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ont été menés à une charge de 0,46g de OH-/g de biomasse sèche (2,7 mol/Kg) à 50°C et 20°C pendant 7 jours sur du

switchgrass et du miscanthus. A l'insu de cette étude, le taux de délignification obtenu pour NaOH et KOH n'a pas été significativement différent, tout comme le taux de conversion de cellulose en glucose par hydrolyse enzymatique dans la plupart des cas. Des différences sur le mode d'activation des deux bases ont été référencées dans la littérature comme des possibles causes aux différences observées lors de l'emploi de KOH et NaOH pour le prétraitement alcalin (Raymundo-Piñero et al., 2005; Sharma et al., 2013).

#### 2.4.3.2 Eléments d'évaluation économique

Afin d'évaluer le coût relié aux produits chimiques employés dans le prétraitement, une simulation a été réalisée à échelle industrielle en employant les données expérimentales des essais présentés ci-dessus et les données employées pour le projet BABETHANOL pour la partie enzymatique. Cette simulation est réalisée sur la base d'un apport en coproduit de maïs doux de 30000 tonnes par an et avec une production de 300 jours par an. Les données concernant le coût des produits chimiques sont regroupées dans le **Tableau 2.36**. La soude, de par son prix de vente inférieur et sa plus grande efficacité pour le prétraitement conduit à un coût inférieur à celui obtenu avec la potasse. En raison de la diminution de la quantité d'agent alcalin employée lors du prétraitement, la quantité et donc le coût de l'acide nécessaire à la neutralisation est réduit. Ainsi, le couple NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conduit à un coût annuel proche de 1 500 000€/an alors qu'en utilisant le couple KOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> le coût serait doublé (3 100 000 €/an). Toute fois ces estimations du coût ne concernent que la fourniture en produit chimiques (base et acide) et ne tiennent pas compte de la valorisation et des traitements des effluents.

**Tableau 2.36** Coût relié aux produits chimiques pour la production d'un an à l'échelle semi-industrielle réalisée par la société MAGUIN

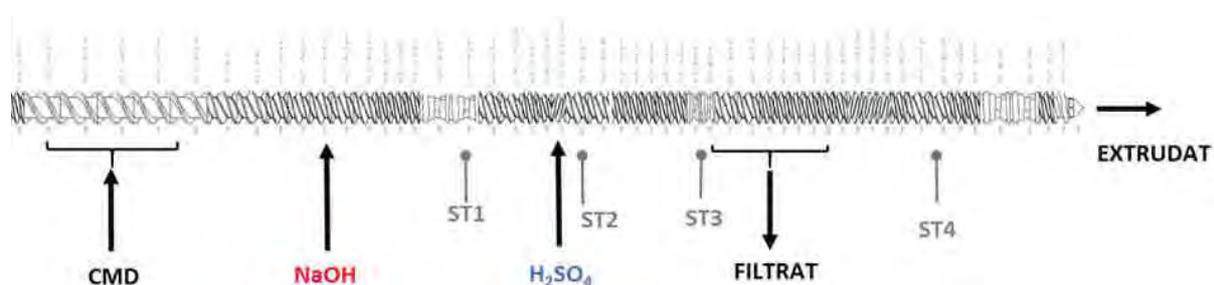
		KOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Base pure	Consommation (Kg/an)	355	208
	Coût (€/an)	2 504 880	1 034 842
Acide pure	Consommation (Kg/an)	298	242
	Coût (€/an)	596 477	484 387
Coût total produits chimiques ((€/an))		3 101 357	1 519 229

A partir des données de la simulation du procédé à l'échelle industrielle réalisée par la société MAGUIN, et d'une étude environnementale réalisée par la société APYGEC ; Les résultats obtenus sur l'efficacité énergétique et l'empreinte carbone n'ont pas permis de montrer laquelle des deux bases est la plus intéressante en termes environnementaux. De ce fait, la décision a été prise au niveau du consortium du projet BABET REAL 5 de poursuivre les études avec la soude.

## 2.5 Passage à l'échelle pilote du prétraitement alcalin

### 2.5.1 Mise en place des conditions d'extrusion

L'étude du prétraitement à échelle pilote a été réalisée avec un extrudeur Evolum 53, sur les installations du LCA à AGROMAT (Tarbes). La **Figure 2.29** et le **Tableau 2.37** montre en détail le profil de vis employé pour cette étude ainsi qu'un schéma de celui-ci. L'entrée en hydroxyde de sodium a lieu à la fin du module 3 et celle de la solution acide au niveau du module 5. Les modules 1 et 2 dédiés à l'alimentation en matière ainsi que le module de filtration ne sont pas thermo-régulés. De plus, quatre sondes de température ont été placées afin de suivre la température dans l'extrudeur.



**Figure 2.29** Configuration et profil de vis utilisé pour l'étude de l'influence de la température et du ratio NaOH/CMD sec sur du coproduit de maïs doux ; SP : Sondes de température



Les conditions opératoires employées pour cet essai sont rassemblées dans le **Tableau 2.38**. Les caractéristiques des deux extrudeurs sont données EV25 et EV53. (**Tableau 2.39**) à titre comparatif, les conditions de prétraitement à l'échelle du laboratoire sur l'extrudeur EV25 ont été rajoutées. Les deux essais ont été menés en utilisant le lot de CMD 1, broyé au préalable à 6 mm. A l'échelle pilote, le coproduit de maïs doux a été introduit a un débit de 30 Kg/h pour un débit en matière sèche de 27,75 Kg/h. La température de consigne a été fixée à 138°C, dans ces conditions la température de matière mesurée au niveau de cette zone était de 122°C, donc légèrement inférieur à la température atteinte dans cette même zone présentée ici à l'échelle laboratoire. D'autre part, dans la perspective d'une industrialisation du procédé, le taux de remplissage global, définit comme le rapport du débit d'alimentation solide (Qs) sur la vitesse de rotation des vis (SS), a été augmenté fortement passant de 0,06 à 0,15 kg.h<sup>-1</sup>.rpm<sup>-1</sup>. Les consignes des zones 6 à 9 sont choisies de manière à refroidir rapidement la matière en fin de module 4, la matière n'est qu'à 107°C et la température décroît pour atteindre des valeurs proches de 50°C dans la zone de bioextrusion (module 9).

**Tableau 2.38** Conditions opératoires à échelle pilote et laboratoire du prétraitement alcalin

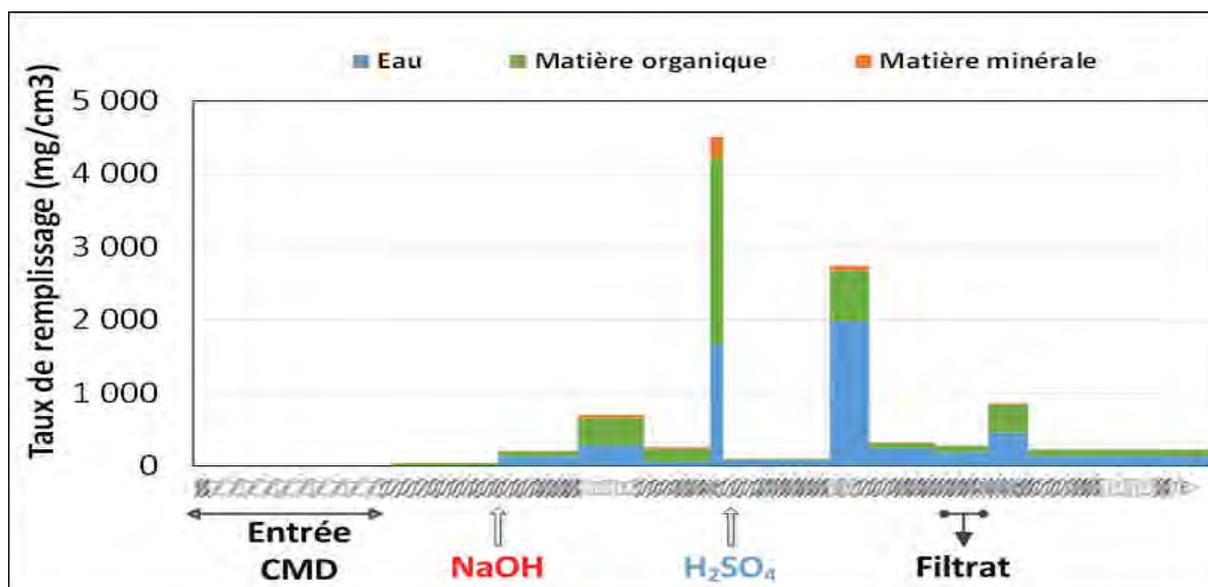
	Unité	Pilote	Laboratoire
Lot de CMD		1	1
Extrudeur		EV53	EV25
Granulométrie	mm	6	6
SS	rpm	200	300
Taux de remplissage global	Kg.h <sup>-1</sup> .rpm <sup>-1</sup>	0,15	0,006
SME	Wh/Kg	101,2	425
Qs	Kg/h	30	1,8
Q NaOH	Kg/h	28,2	1,62
[NaOH]	% (m/m)	5,9	5,9
QH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kg/h	95,4	5,7
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	% (m/m)	1,6	1,6
Q <sub>ext</sub>	Kg/h	63,7	3,01
MS <sub>ext</sub>	%	38,84	42,8
NaOH/CMD sec	% (g/Kg sec )	6	5,8
OH-/CMD sec	mol/Kg	1,5	1,44
L/S b	Kg.h <sup>-1</sup> /Kg.h <sup>-1</sup>	1	1
L/S a	Kg.h <sup>-1</sup> /Kg.h <sup>-1</sup>	4	4
Base/Acide	mol/mol	2,7	2,7
Q <sub>fil</sub>	Kg/h	67,2	6
MS <sub>fil</sub>	%	9,6	8,1
MM <sub>fil</sub>	%MS	29,3	30,7
Température ST1	°C	122,6	125-129
Température ST2	°C	107,5	
Température ST3	°C	33,4	
Température ST4	°C	54,8	46-47

Note :SS : Vitesse de vis ; rpm : rotation par minute ; Qs : Débit de CMD ; MS ext et MSfil: Matière Sèche de l'extrudat et du filtrat ; L/S b : Ratio liquide/solide phase de déstructuration ; Ratio L/Sa : Ratio Liquide/Solide phase de neutralisation ; Q NaOH : Débit solution NaOH ; QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Débit solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Tableau 2.39** Caractéristiques des extrudeurs EV25 (échelle laboratoire) et EV53 (pilot)

	Unité	EV25	EV53
Puissance	Kw	35,5	152
Diamètre du fourreau intérieur	mm	25	53,15
Longueur du module	mm	24,8	52,45
Diamètre de vis	mm	100	212,6 (x5)
Volume filtre sur 6 premiers modules	cm <sup>3</sup>	230	2671

Le taux de remplissage de l'extrudeur au cours du procédé a été estimé à l'échelle pilote, les résultats sont regroupés dans la **Figure 2.30**. Ils permettent d'observer les zones d'accumulation de la matière le long du fourreau de l'extrudeur. C'est ainsi, qu'au niveau de la zone de déstructuration de la matière par la soude, le taux de remplissage augmente au niveau des bilobes. Par la suite, le taux de remplissage augmente de manière importante au niveau de chaque zone de contrainte.



**Figure 2.30** Taux de remplissage des vis pendant le prétraitement à la soude et la neutralisation à l'acide sulfurique de l'extrudeur EV53

### 2.5.2 Composition de l'extrudat de CMD prétraité obtenu avec l'extrudeur EV53

Les données de composition des extrudat obtenus à l'échelle pilote et celui obtenu à l'échelle laboratoire ont été regroupés sur le **Tableau 2.40**. Les bilans massiques reportés à 100Kg de matière sèche entrante sont regroupés sur la **Figure 2.31**. La comparaison des matières sèches des extrudats fait apparaître une légère différence de l'efficacité de filtration, celle-ci est légèrement plus efficace à

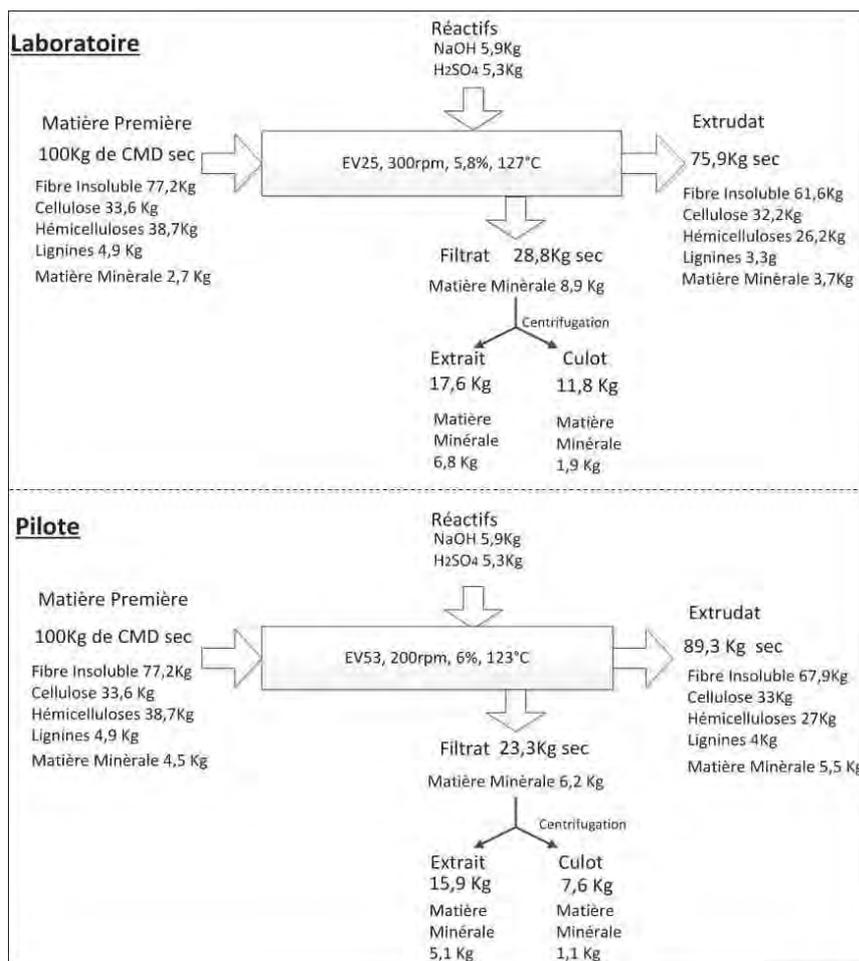
l'échelle laboratoire. Et les bilans massiques montrent bien que la quantité de filtrat obtenu est plus faible à l'échelle pilote. Le changement d'échelle et la modification du taux de remplissage globale, peut provoquer une modification du bouchon dynamique formé et de ce fait induire un changement du comportement du pressage de la matière lors de la filtration. De cette manière la quantité de solides récupérés dans l'extrudat augmente, et la quantité de matière extraite solubilisée dans le filtrat diminue.

D'autre part, en termes de déstructuration des résultats similaires sont obtenus. En raison d'une diminution de la matière sèche de l'extrudat pour l'essai mené à échelle pilote, la proportion de la fibre insoluble est plus faible par rapport à celle obtenue à l'échelle laboratoire. Cependant, les proportions des fractions de cellulose, hémicelluloses et lignines dans la fibre insoluble ont peu varié dans les deux cas. C'est pourquoi, les résultats des bilans massiques aboutissent à des quantités de cellulose, hémicelluloses et lignines similaires. L'ensemble de ces résultats indiquent, que le passage à l'échelle pilote et la modification du taux de remplissage global impacte faiblement l'effet de déstructuration du CMD.

**Tableau 2.40** Composition de la matière brute et des extrudats obtenus à l'échelle pilote et laboratoire

		CMD lot 1	Extrudat pilote	Extrudat laboratoire
<b>Matière sèche</b>	<b>%</b>	<b>92,3</b>	<b>38,8</b>	<b>42,8</b>
Fibre insoluble	% MS	77,2	76	81,2
Cellulose	%FI (%MS)	43,5 (33,6)	48,6 (36,9)	52,2 (42,4)
Hémicelluloses	%FI (% MS)	50,1 (38,7)	39,5 (30)	42,5 (34,5)
Lignine	%FI (% MS)	6,3 (4,7)	5,8 (4,4)	5,3 (4,3)

MS : Matière Sèche ; CMD : Coproduit de maïs Doux ; FI : Fibre Insoluble



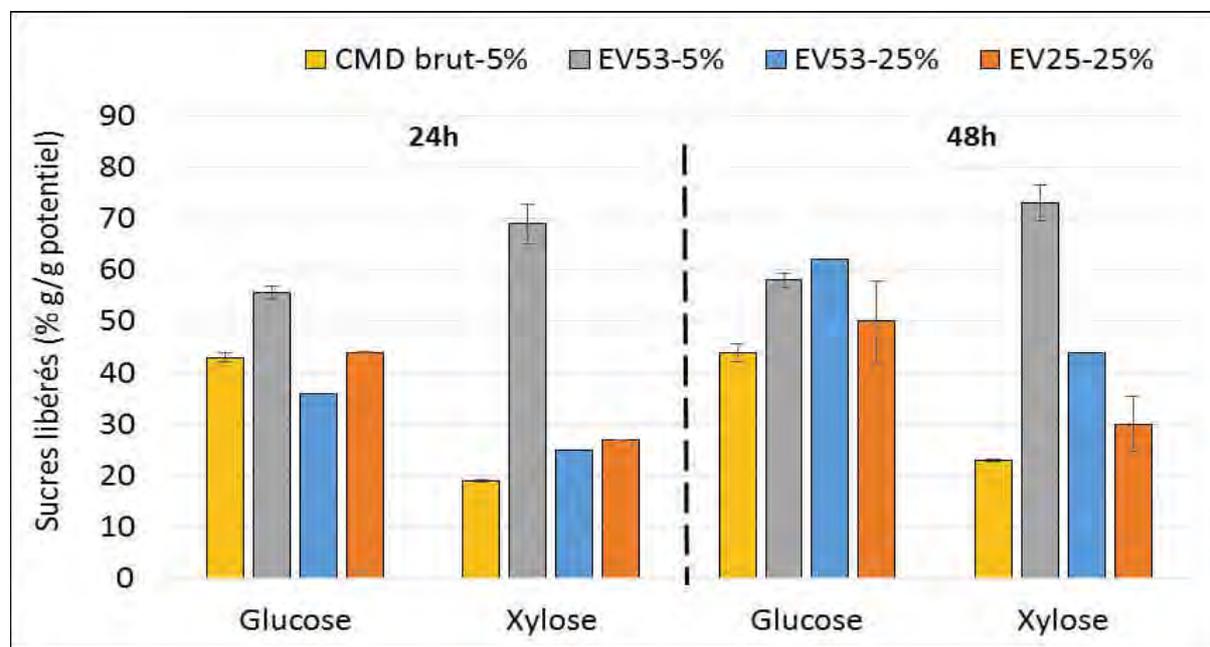
**Figure 2.31** Bilan massiques pour 100Kg de CMD sec à l'échelle laboratoire et pilote

### 2.5.3 Hydrolyse enzymatique de l'extrudat de CMD obtenu avec l'extrudeur EV53

L'hydrolysabilité de l'extrudat obtenu à l'échelle pilote a été caractérisée (**Figure 2.32**). Les résultats de sucres libérés (GL, XL et SL) à 5% de consistance indiquent une amélioration de l'accessibilité des enzymes à leur substrat grâce au prétraitement. Au bout de 24h, un rendement total en glucose et en xylose de 36% est obtenu, ce qui correspond à 36g pour 100 de CMD sec. Cette valeur évolue faiblement au bout de 48h, arrivant à 38%. Le taux de sucres produit est ainsi doublé par rapport à la matière non traitée.

D'autre part, l'hydrolyse enzymatique de l'extrudat a également été menée à haute consistance (25%) à l'échelle pilote avec une charge enzymatique de 15 FPU/g d'extrudat sec. Les résultats obtenus sont comparés à une hydrolyse enzymatique menée sur un extrudat produit à l'échelle laboratoire sur EV25 avec une même consistance de 25% mais une charge enzymatique légèrement inférieure (de 10 FPU/g d'extrudat sec) (**Figure 2.32**). Les taux de glucose et de xylose libérés après 24h d'hydrolyse sont très proches pour les deux extrudats, mais des taux de sucres supérieurs sont obtenus avec l'extrudat de l'EV53 après 48h d'hydrolyse. De cette manière les résultats indiquent que le transfert à l'échelle pilote

n'affecte pas le taux de sucres produits à partir des extrudats. Bien que la charge enzymatique ne soit pas la même, les résultats sont très proches. La différence observée est probablement liée à la différence de charge enzymatique.



**Figure 2.32** Hydrolyse enzymatique de la matière non traité (CMD brut-5%) et de l'extrudat obtenu à échelle pilote (EV53-5%) dans les conditions d'hydrolysabilité à 5% (m/m) de consistance et de extrudat obtenu à l'échelle pilote (EV53-25%) et de l'extrudat obtenu avec l'EV25 (EV25-25%) à 25% (m/m) de consistance après 24h et 48h

#### 2.5.4 Conclusion

Un essai à l'échelle pilote de prétraitement alcalin avec neutralisation et filtration dans les conditions optimales déterminées à l'échelle laboratoire, a été mené. Les résultats de caractérisation des extrudats ont mis en évidence une diminution de l'efficacité de la filtration à échelle pilote dans des conditions de taux de remplissage globale plus élevé comparé à l'échelle laboratoire.

#### 2.6 Conclusion du chapitre

A l'issu du projet BABETHANOL, le prétraitement alcalin était réalisé en utilisant de la soude avec un ratio NaOH/CDM sec de 10% (2,5 mol de OH-/Kg de CMD sec) et une température de 90°C. L'acide phosphorique était employé pour neutraliser. Ces conditions permettaient d'atteindre des rendements en glucose et xylose élevés, cependant la viabilité économique du procédé n'était pas assurée. Le coût opérationnel relié aux produits chimiques représentait 44,5% des coûts opérationnels raison pour laquelle les travaux d'optimisation du prétraitement alcalin ont été entrepris. L'étude des conditions de prétraitement ont ainsi été étudiées au long de ce chapitre, en réalisant des essais avec 3 différents types d'alcalin et dans des conditions de charge alcalin et de température différentes. Les

résultats ont abouti à une diminution de la charge en soude de 4% et une augmentation de la température de 40°C, tout en gardant des rendements en glucose et xylose élevées (500g pour 1Kg de CMD sec).

Les résultats de ce chapitre ont permis une diminution du coût opératoire du procédé, mis en évidence par une étude du bilan des produits et des charges **Tableau 2.41**. Les coûts opératoires ont ainsi été diminués de 5 millions d'euros tout en conservant des revenus en éthanol et méthane. Cette étude a pris en compte les conditions optimisées du prétraitement alcalin indiquées dans ce chapitre, cependant les conditions d'hydrolyse enzymatique n'ont pas été modifiées par rapport à celles employées dans le projet BABETHANOL, L'étude de ces conditions sera étudiée dans le chapitre suivant.

**Tableau 2.41** Comparaison des bilans des produits et des charges de BABET REAL 5 et BABETHANOL dans le cas du coproduit de maïs doux

<b>Bilan des produits et charges</b>	<b>BABET-REAL5</b>	<b>BABETHANOL</b>
Recette en éthanol	3 171 535 €/an	2 871 441 €/an
Recette en méthane	5 296 356 €/an	6 937 196 €/an
<b>Total rentrée des produits</b>	<b>8 467 891 €/an</b>	<b>9 777 582 €/an</b>
Total des dépenses opérationnelles	7 316 480 €/an	12 681 317 €/an
Coût de la main d'œuvre	1 030 000 €/an	805 000 €/an
<b>Total des coûts opératoires</b>	<b>8 346 480 €/an</b>	<b>13 486 317 €/an</b>

## 2.7 Références

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Bonazzi, C., Bimbenet, J.-J., 2008. Séchage des produits alimentaires - Appareils et applications [WWW Document]. Ref: TIP700WEB - “Agroalimentaire.” URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/42430210-operations-unitaires-du-genie-industriel-alimentaire/download/f3002/sechage-des-produits-alimentaires.html> (accessed 1.27.19).
- Casey, E., Mosier, N.S., Adamec, J., Stockdale, Z., Ho, N., Sedlak, M., 2013. Effect of salts on the Co-fermentation of glucose and xylose by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 6, 83. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-83>
- Chen, Y., Stevens, M.A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H., 2013. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification 10.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S., 2010. Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 1768–1784. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8958-4>
- Cherubini, F., Ulgiati, S., 2010. Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study. *Applied Energy* 87, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.08.024>
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., Cherchi, F., 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, International Conference on Lignocellulosic ethanol 46, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020>
- Choi, W.-I., Oh, K.-K., Park, J.-Y., Lee, J.-S., 2014. Continuous sodium hydroxide-catalyzed pretreatment of empty fruit bunches (EFB) by continuous twin-screw-driven reactor (CTSR). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89, 290–296. <https://doi.org/10.1002/jctb.4119>
- Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., 2017. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res* 17. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox036>
- Dong Yang, Yi Zheng, Ruihong Zhang, 2009. Alkali Pretreatment of Rice Straw for Increasing the Biodegradability, in: 2009 Reno, Nevada, June 21 - June 24, 2009. Presented at the 2009 Reno, Nevada, June 21 - June 24, 2009, American Society of Agricultural and Biological Engineers. <https://doi.org/10.13031/2013.26933>
- Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering* 101, 913–925. <https://doi.org/10.1002/bit.21959>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2014. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel* 134, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.084>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2013. Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 48, 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.003>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renewable Energy* 114, 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>

- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C., 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327, 812–818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- IRENA, 2016. Innovation Outlook Advanced Biofuels 2016 Summary | Biofuel | Gasification.
- Kaar, W.E., Holtzapple, M.T., 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy* 18, 189–199. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00091-4)
- Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Adjallé, K., Barnabé, S., Beauregard, M., 2018. Determination of optimal biomass pretreatment strategies for biofuel production: investigation of relationships between surface-exposed polysaccharides and their enzymatic conversion using carbohydrate-binding modules. *Biotechnology for Biofuels* 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1145-5>
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology, Pretreatment of Biomass* 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Kim, S., Holtzapple, M.T., 2006. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. *Bioresource Technology* 97, 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.002>
- Kim, S., Holtzapple, M.T., 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology, Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies* 96, 1994–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.014>
- Leggett, L.M.W., Ball, D.A., 2012. The implication for climate change and peak fossil fuel of the continuation of the current trend in wind and solar energy production. *Energy Policy* 41, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.11.022>
- Liu, C., van der Heide, E., Wang, H., Li, B., Yu, G., Mu, X., 2013. Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnol Biofuels* 6, 97. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-97>
- Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., Wang, H., 2018. Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production. *Fuel* 221, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.088>
- Liu, X., Zicari, S.M., Liu, G., Li, Y., Zhang, R., 2015. Pretreatment of wheat straw with potassium hydroxide for increasing enzymatic and microbial degradability. *Bioresour. Technol.* 185, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.047>
- Makoumbou, U., 1988. Raffinage des agroressources : la valorisation séquencée des sous-produits de conserverie de maïs doux (thesis). Toulouse, INPT.
- Modenbach, A., 2013. Sodium hydroxide pretreatment of corn stover and subsequent enzymatic hydrolysis: An investigation of yields, kinetic modeling and glucose recovery. Theses and Dissertations--Biosystems and Agricultural Engineering.
- Ong, Chuah, Chew, 2010. Comparison of Sodium Hydroxide and Potassium Hydroxide Followed by Heat Treatment on Rice Straw for Cellulase Production under Solid State Fermentation - SciAlert Responsive Version. <https://doi.org/10.3923/jas.2010.2608.2612>
- Paixão, S.M., Ladeira, S.A., Silva, T.P., Arez, B.F., Roseiro, J.C., Martins, M.L.L., Alves, L., 2016. Sugarcane bagasse delignification with potassium hydroxide for enhanced enzymatic hydrolysis. *RSC Advances* 6, 1042–1052. <https://doi.org/10.1039/C5RA14908H>
- Prior, B.A., Day, D.F., 2008. Hydrolysis of Ammonia-pretreated Sugar Cane Bagasse with Cellulase,  $\beta$ -Glucosidase, and Hemicellulase Preparations. *Appl Biochem Biotechnol* 146, 151–164. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8084-0>
- Putro, J.N., Soetaredjo, F.E., Lin, S.-Y., Ju, Y.-H., Ismadji, S., 2016. Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances* 6, 46834–46852. <https://doi.org/10.1039/C6RA09851G>
- Raymundo-Piñero, E., Azais, P., Cacciaguerra, T., Cazorla-Amorós, D., Linares-Solano, A., Béguin, F., 2005. KOH and NaOH activation mechanisms of multiwalled carbon nanotubes with different structural organisation. *Carbon* 43, 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.11.005>

- Rodrigues, C.I.S., Jackson, J.J., Montross, M.D., 2016. A molar basis comparison of calcium hydroxide, sodium hydroxide, and potassium hydroxide on the pretreatment of switchgrass and miscanthus under high solids conditions. *Ind. Crop. Prod.* 92, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.010>
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL* 30, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A., 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy Environ. Sci.* 4, 1306–1310. <https://doi.org/10.1039/C0EE00378F>
- Schleussner, C.-F., Rogelj, J., Schaeffer, M., Lissner, T., Licker, R., Fischer, E.M., Knutti, R., Levermann, A., Frieler, K., Hare, W., 2016. Science and policy characteristics of the Paris Agreement temperature goal. *Nature Climate Change* 6, 827–835. <https://doi.org/10.1038/nclimate3096>
- Sharma, R., Palled, V., Sharma-Shivappa, R.R., Osborne, J., 2013. Potential of Potassium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Fermentable Sugar Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 761–772. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0009-x>
- Silva, A.S. da, Teixeira, R.S.S., Endo, T., Bon, E.P.S., Lee, S.-H., 2013. Continuous pretreatment of sugarcane bagasse at high loading in an ionic liquid using a twin-screw extruder. *Green Chem.* 15, 1991–2001. <https://doi.org/10.1039/C3GC40352A>
- Singh, I., Langyan, S., Yadava, P., 2014. Sweet Corn and Corn-Based Sweeteners. *Sugar Tech* 16, 144–149. <https://doi.org/10.1007/s12355-014-0305-6>
- Soest, V., J, P., Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 51, 780–785.
- Solomon, B.D., 2010. Biofuels and sustainability, in: Limburg, K., Costanza, R. (Eds.), *Ecological Economics Reviews*. Wiley-Blackwell, Malden, pp. 119–134.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology, Reviews Issue* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez-Melendez, O., Evon, P., Barzana, E., Vilarem, G., Rigal, L., 2016. Suitability assessment of a continuous process combining thermo-mechano-chemical and bio-catalytic action in a single pilot-scale twin-screw extruder for six different biomass sources. *Bioresource Technology* 211, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.072>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014a. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products* 55, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Industrial Crops and Products* 67, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Vandenbossche, V., Doumeng, C., Rigal, L., 2014b. Thermomechanical and Thermo-mechano-chemical Pretreatment of Wheat Straw using a Twin-screw Extruder. *BioResources* 9, 1519-1538–1538. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.1519-1538>
- Xu, J., Cheng, J.J., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., 2010a. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology* 101, 2900–2903. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.015>
- Xu, J., Cheng, J.J., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., 2010b. Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production. *Energy Fuels* 24, 2113–2119. <https://doi.org/10.1021/ef9014718>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66, 751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>

- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zhang, X., Xu, J., Cheng, J.J., 2011. Pretreatment of Corn Stover for Sugar Production with Combined Alkaline Reagents. *Energy Fuels* 25, 4796–4802. <https://doi.org/10.1021/ef201130d>
- Zheng, J., Choo, K., Rehmann, L., 2015. The effects of screw elements on enzymatic digestibility of corncobs after pretreatment in a twin-screw extruder. *Biomass and Bioenergy* 74, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.01.022>

# Chapitre III : Etude des facteurs de la bioextrusion et de l'hydrolyse enzymatique pour couplage du prétraitement- saccharification- fermentation

## Table des matières

3. Etude des facteurs de bioextrusion et de l'hydrolyse enzymatique pour le couplage du prétraitement-saccharification-fermentation.....	193
3.1 Introduction.....	193
3.2 Matériels et méthodes .....	195
3.2.1 Essais de bioextrusion .....	195
3.2.2 Préparation des solutions enzymatiques .....	197
3.2.3 Caractérisation des matières produites .....	198
3.2.4 Saccharification des matières prétraitées.....	198
3.3 Résultats .....	199
3.3.1 Influence des conditions de bioextrusion sur la destructuration de la matière .....	199
3.3.2 Influence des conditions de bioextrusion sur l'hydrolyse enzymatique des bioextrudats	207
3.3.3 Etude du couplage de la bioextrusion en extrudeur bi-vis avec la saccharification- fermentation des sucres en réacteur agité .....	219
3.4 Conclusion du chapitre.....	233
3.6 Références.....	236

### **3. Etude des facteurs de bioextrusion et de l'hydrolyse enzymatique pour le couplage du prétraitement-saccharification-fermentation**

#### **3.1 Introduction**

De façon générale la bioextrusion peut se définir comme la mise en œuvre d'un ou plusieurs types d'enzymes comme biocatalyseur dans un procédé de transformation d'un substrat agrosourcé réalisé dans un extrudeur bi-vis. Dans notre cas, le procédé inclut le prétraitement alcalin de la biomasse lignocellulosique suivi d'une étape de neutralisation. Les enzymes hydrolytiques sont ensuite introduits directement dans l'extrudeur. L'exsudat ainsi produit en sortie d'extrudeur est un mélange de biomasse prétraitée et d'enzymes qui peut être introduit directement dans un réacteur afin de poursuivre la saccharification et réaliser la fermentation des sucres après ajout des levures. De cette manière, les facteurs qui ont une influence sur la bioextrusion et sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et les hémicelluloses doivent être pris en compte afin d'optimiser la production de sucres pour la fermentation.

Les premiers cas d'étude de bioextrusion, répertoriés sur de la biomasse concernent l'emploi d' $\alpha$ -amylases pour la liquéfaction de l'amidon. Lors de la bioextrusion de l'amidon, l'action des  $\alpha$ -amylases a lieu dans un extrudeur afin de produire des maltodextrines. Ce substrat est par la suite saccharifié, généralement dans un réacteur séparé, car cette étape requiert des temps de réaction plus longs, mais dans certains cas la mise en contact des  $\beta$ -glucosidases a lieu aussi dans l'extrudeur. Ces études relèvent l'importance de la charge enzymatique appliquée et du taux d'humidité de la matière lors de l'étape de bioextrusion comme facteurs principaux pour l'obtention d'un bon rendement en malto dextrines, et donc par la suite de glucose. D'autres facteurs ont été identifiés, tels que la température, la vitesse de rotation et le profil de vis, et le temps de résidence de la matière dans l'extrudeur. De plus, ces études ont permis de mettre en évidence la conservation de l'activité enzymatique des  $\alpha$ -amylases pendant et après le procédé d'extrusion ; cependant elle dépend des conditions employées (Baks et al., 2008; Gatt et al., 2018; Govindasamy et al., 1997).

L'hydrolyse enzymatique de la matière prétraitée reste un des verrou technique pour atteindre une production de bioéthanol compétitive en termes de coût et d'impact environnemental (Klein-Marcuschamer et al., 2012). Pour parvenir à un procédé économiquement viable, il est nécessaire d'appliquer une charge enzymatique minimale tout en gardant un rendement élevé. D'après Yang et al., (2017), la production d'éthanol cellulosique doit être réalisée avec une charge enzymatique comprise entre 9-12.5 FPU/g de glucane et un rendement supérieur à 80% en glucose (Yang et al.,

2017). Des nombreuses études sur les facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique ont été réalisées afin de maximiser le rendement en glucose et xylose (Nahar et al., 2017; Ramos et al., 2015; Yang et al., 2017). Un rendement élevé en glucose va dépendre notamment de la charge enzymatique, de la consistance du milieu, du type de cocktail enzymatique employé, de la température, du pH et de l'agitation du réacteur. Les rendements en xylose varient selon ces facteurs, mais aussi du type de prétraitement employé en amont. Dans le cas des prétraitements de type explosion à la vapeur et acide, la partie hémicellulosique restante dans la matière va être plus faible comparé à celle obtenue avec un prétraitement de type alcalin (Chundawat et al., 2017). La conversion de la cellulose en glucose et des xylanes en xylose, peut être améliorée par un apport supplémentaire en enzymes hémicellulolytiques. Les hémicelluloses forment une barrière pour les enzymes mais aussi sont une source potentielle de sucres. Ainsi, l'apport en hémicellulases peut permettre d'atteindre un compromis entre le coût des enzymes et le rendement en éthanol (Gao et al., 2011; Nahar et al., 2017).

D'un autre côté, une diminution des coûts des installations et de l'énergie consommée lors de l'étape de distillation de l'éthanol peut être obtenue avec une hydrolyse enzymatique réalisée à haute consistance. Il s'agit donc de réaliser la saccharification à une teneur en solides supérieure ou égale à 20% (m/m) (Humbird et al., 2010)(Larsen et al., 2008). Cependant, l'hydrolyse enzymatique à haute consistance est reliée à plusieurs problématiques : la faible teneur en eau, le faible transfert de masse et l'inhibition des enzymes par des produits de dégradation ou par des produits de l'hydrolyse (cf. chapitre 1).

L'application de la bioextrusion à la biomasse lignocellulosique est apparue assez récemment et peu d'études ont été réalisées à son sujet (Duque et al., 2014; Vandebossche et al., 2015, 2016; Gatt et al., 2018). L'étude de Vandebossche et al., (2015) sur l'analyse de l'imprégnation enzymatique en extrudeur bi-vis de l'extrudat de coproduit de maïs doux prétraité à la soude, a permis de mettre en évidence l'action des enzymes cellulo-hémicellulosiques pendant la bioextrusion. Cette étude, ainsi que des études sur l'effet de la charge enzymatique et du ratio L/S sur la production de sucres, ont été réalisées en deux étapes séparées dans deux extrudeur bi-vis différents: une première étape de prétraitement alcalin dans un extrudeur BC 45 et l'étape de bioextrusion dans un extrudeur bi-vis de type BC21 (Brault, 2013).

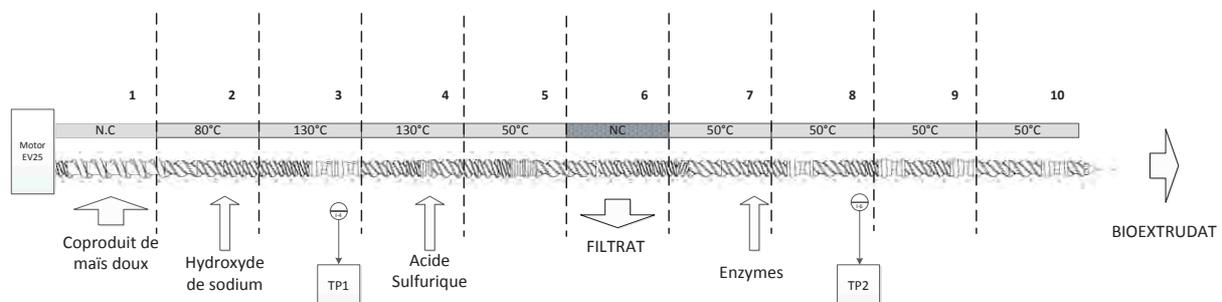
L'objectif de ce chapitre est d'évaluer le couplage du procédé de prétraitement alcalin-neutralisation-filtration-imprégnation enzymatique en extrudeur bi-vis avec la saccharification et la co-fermentation simultanée (SSCF) en continue à l'échelle pilote de laboratoire. Dans une première partie, les impacts sur la saccharification à haute consistance des principaux facteurs de bioextrusion, tel que le ratio liquide/solide et la charge enzymatique, ont été évalués. La deuxième partie, traite de

l'implémentation du procédé intégré de production de bioéthanol en continu à partir du coproduit de maïs doux en employant un bioréacteur d'une capacité de 22L couplé à l'extrudeur bi-vis EV25.

### 3.2 Matériels et méthodes

#### 3.2.1 Essais de bioextrusion

Les expériences de bioextrusion ont toutes été réalisées dans l'extrudeur type EVOLUM25 (EV25) en employant le même profil de vis que celui utilisé pour le prétraitement alcalin avec de la soude (cf. Chapitre 2.4.3). La configuration de l'extrudeur EV25 employée pour toutes les expériences est représentée sur la **Figure 3.1**. L'introduction du coproduit de maïs doux est réalisée au niveau du module 1 qui possède une ouverture reliée à une trémie d'alimentation qui le débite de manière régulière. La biomasse est ensuite prétraitée à la soude et neutralisée à l'acide sulfurique. Les conditions recherchées correspondent à un ratio NaOH/SCC sec de 5.9% (m/m) et une température de matière de 130°C. Après l'étape de filtration dans l'extrudeur au niveau du module 6, la solution enzymatique est introduite en fin du module 7. A partir du module 7 jusqu'au module 10, la température de consigne a été fixée à 50°C ; cette température correspond à la température optimale d'hydrolyse pour les enzymes utilisées (cf. Chapitre 4). Le débit de la solution enzymatique est contrôlé en suivant la différence de masse à l'aide d'une balance placée en-dessous du contenant de la solution (**Figure 3.2**).



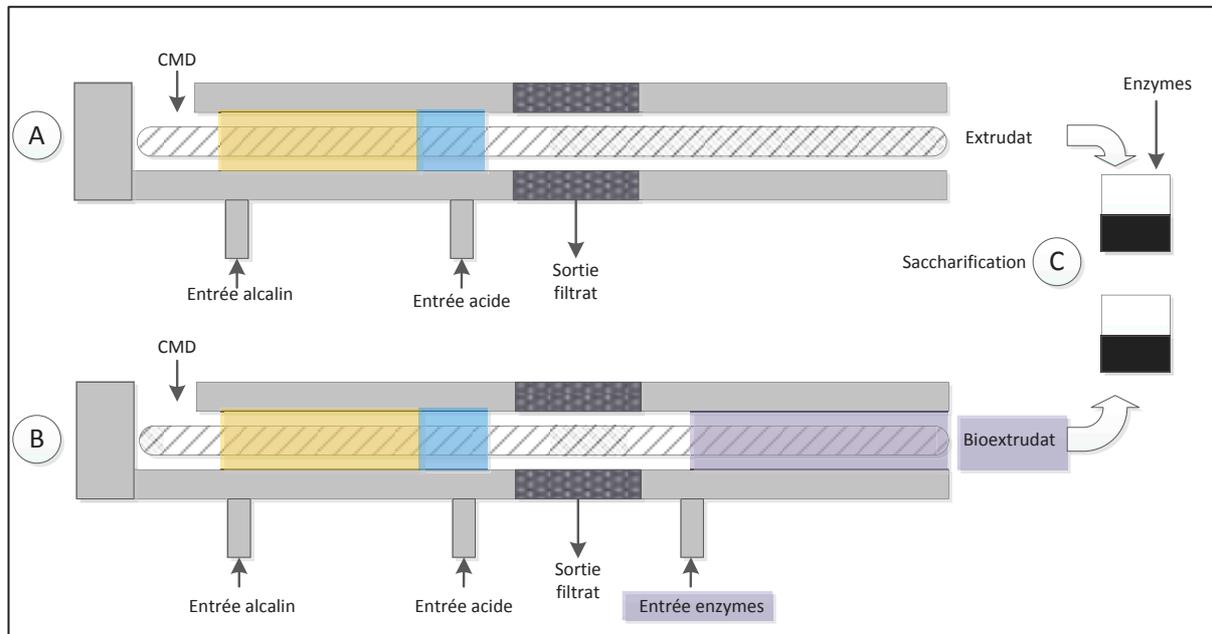
**Figure 3.1** Schéma de la configuration et du profil de vis employé pour les expériences de bioextrusion sur EV25, les températures indiquées correspondent aux températures de consigne des fourreaux ; TP : Sonde de température



**Figure 3.2** Photo de l'extrudeur EV 25 lors des expériences de bioextrusion

En préalable aux essais de bioextrusion, des essais sont réalisés sans alimentation de la solution enzymatique afin d'obtenir des conditions d'extrusion stables et de déterminer la matière sèche de la matière prétraitée, neutralisée et filtrée. Cette expérience sera nommée par la suite « extrusion » et correspondra aux conditions sans injection d'enzymes. Une fois la matière sèche de l'extrudat (sans enzymes) déterminée, le débit de la solution enzymatique est réglée afin d'atteindre une charge enzymatique donnée. Le débit est contrôlé en suivant la perte de masse sur la balance. En régime de fonctionnement stabilisé, les essais sont réalisés avec une durée moyenne de 15min. Pour chacun de ces essais, la matière sèche du bioextrudat est mesurée, directement en sortie d'extrudeur, dans le but d'établir les bilans matière. Pour les expériences de bioextrusion, la saccharification est poursuivie directement en réacteur batch, après ajustement de la consistance initiale à laquelle la saccharification est réalisée. Les matières sèches de l'extrudat et du bioextrudat en sortie d'extrudeur sont contrôlées en utilisant une balance infra-rouge (MA35, Sartorius).

Les résultats obtenus avec les bioextrudats produits utilisés directement après leur sortie de l'extrudeur pour réaliser la saccharification ou saccharification/fermentation en batch fermé sont comparés à ceux obtenus à partir d'extrudat avec ajout d'enzymes dans le réacteur de saccharification (**Figure 3.3**).



**Figure 3.3** Représentation schématique des expériences de bioextrusion ; A : production de l'extrudat ; B : production du bioextrudat ; C : Saccharification de l'extrudat avec ajout des enzymes et du bioextrudat

### 3.2.2 Préparation des solutions enzymatiques

Les cocktails enzymatiques employés lors des essais de bioextrusion sont le Cellic Ctec 2 et NS22002 de Novozymes (Francklinton, USA), dont les caractéristiques sont détaillées au chapitre 4. Le cocktail Cellic Ctec 2 possède des cellulases (123 FPU/mL) et des hémicellulases, le cocktail NS22002 permet de le compléter en activités hémicellulosiques notamment en xylanases, féruloyl esterases et acétyl estérase. Les deux cocktails enzymatiques ont été fournis sous forme liquide, dans des solutions comportant des agents stabilisants. Initialement dans les expériences de bioextrusion, une préparation composée de 90% Cellic Ctec 2 et 10% NS22002 sur une base volumique a été employée. Par la suite, ce mélange enzymatique a été modifié afin de tester l'influence de l'apport en hémicellulases du cocktail NS22002. De ce fait, la solution enzymatique employée comportait soit uniquement du cocktail Cellic Ctec 2 seul, soit les deux cocktails avec des ratios variables. D'autre part, les cocktails enzymatiques ont été introduits avec ou sans dilution dans du tampon citrate-phosphate pH 5.0, 0.5mM.

### 3.2.3 Caractérisation des matières produites

Les extrudats et les bioextrudats produits sont analysés par la technique gravimétrique différentielle ADF-NDF-KMNO<sub>3</sub> (Chapitre 4) afin de déterminer leur teneur en fibre insoluble, cellulose, hémicelluloses et lignines. A partir du bilan matière de l'extrusion et caractérisation des matières, les bilans sur la base de 100Kg d'extrudat produits sont réalisés. La matière sèche de bioextrudat obtenue à partir de 100Kg d'extrudat sec à est calculée à partir de l'équation Eq.3.1. A partir de la matière sèche en bioextrudat et de l'analyse de sa teneur en fibre insoluble, cellulose et hémicelluloses, les masses de chacun de ces constituants retirés pendant l'étape de bioextrusion sont déterminées (Eq. 3.2). Rapportés aux masses correspondantes dans l'extrudat du prétraitement obtenu sans ajout d'enzymes, ces données permettent de calculer les indicateurs de bilan massique pour l'étape de bioextrusion (FIS Eq. 3.2, CS Eq. 3.3 et HS Eq 3.4) qui peuvent être considérés comme les rendements en fibre solubilisés, en cellulose et hémicelluloses partiellement hydrolysées par l'action enzymatique.

$$m \text{ bioextrudat sec} = 100/Q_{\text{ext}} * Q_{\text{bioext}} \quad \text{Eq.3.1}$$

$$FIS = (m \text{ FI dans extrudat} - m \text{ FI dans bioextrudat}) / (m \text{ FI extrudat}) \quad \text{Eq.3.2}$$

$$CS = (m \text{ C dans extrudat} - m \text{ C dans bioextrudat}) / (m \text{ C extrudat}) \quad \text{Eq.3.3}$$

$$HS = (m \text{ H dans extrudat} - m \text{ H dans bioextrudat}) / (m \text{ H extrudat}) \quad \text{Eq. 3.4}$$

Où  $m \text{ bioextrudat sec}$  correspond à la masse de bioextrudat sec obtenu pour 100Kg d'extrudat,  $Q_{\text{ext}}$  et  $Q_{\text{bioext}}$  correspondent aux débits secs d'extrudat et de bioextrudat ;  $FIS$  est le taux de fibres insolubles retirées ;  $CS$  est le taux de cellulose solubilisées ;  $HS$  est le taux d'hémicelluloses solubilisées ;  $FI$  : Fibre Insoluble ;  $C$  : Cellulose ;  $H$  correspond aux Hémicelluloses

Lors de l'essai 2 de saccharification-fermentation dans le bioréacteur de 22L, la composition en sucres libres (Chapitre 4, 4.2.5.5) des matières a été déterminée afin de dresser un bilan en glucose et xylose.

### 3.2.4 Saccharification des matières prétraitées

Les matières prétraitées, les bioextrudats et les extrudats ont été hydrolysés en réacteur batch de saccharification afin d'étudier la production de glucose et de xylose à partir de ces matières. Ces hydrolyses enzymatiques sont réalisées à des consistances égales ou supérieures à 20%, dans ce fait des appareillages classiques d'incubation (Chapitre 4) ou dans un réacteur adapté Tornado™ 6 Plus System : **Figure 3.4**. Le dosage du glucose et xylose libérés est réalisé par HPLC ou HPIC (Chapitre 4 (4.2.2.2)).



**Figure 3.4** Photos du système Tornado™ employé pour cette étude

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Influence des conditions de bioextrusion sur la destruction de la matière

##### 3.3.1.1 Caractérisation des extrudats

Les essais de bioextrusion présentés dans ce chapitre ont tous été réalisés pour des conditions de prétraitement, neutralisation et filtration très voisines ( $SS=300$  rpm ;  $Q_s=1,8$  Kg/h ;  $TP1 : 123$  à  $128^\circ\text{C}$  ;  $\text{NaOH}/\text{CMD sec}=5,9$  à  $6,4\%$  ;  $L/Sb=1$  et  $L/Sa=4$ ) pour un même lot de CMD. La composition des extrudats obtenus pour les différentes expériences, en employant le lot de CMD 2 et 3, en l'absence d'ajout d'enzymes varie peu (**Tableau 3.1** et **Tableau 3.2**), validant ainsi la reproductibilité du prétraitement pour l'étude de l'influence des facteurs de l'étape d'introduction des enzymes. Cependant, une différence de la composition de la fibre insoluble de l'extrudat prétraité en fonction du lot est repérée. En effet, en employant, le lot de CMD 2 le taux d'hémicelluloses contenues dans la fibre de l'extrudat est bien plus faible par rapport à celle de l'extrudat employant le lot de CMD 3 (35% par rapport à 46.3%). De ce fait, la fibre de l'extrudat est aussi moins riche en cellulose avec le lot 3 qu'avec le lot 2 (57% pour l'extrudat avec CMD 2 et 49% pour l'extrudat du lot CMD 3). La différence de composition de la matière prétraitée suit la composition de la matière initiale, puisque la fibre du lot de CMD 2 est composée à hauteur de 46% d'hémicelluloses et 47% de cellulose, tandis que celle du lot de CMD 3 à 54% d'hémicelluloses et 42% de cellulose (Chapitre 2).

**Tableau 3.1** Composition des extrudats obtenus de différentes expériences de bioextrusion en employant le lot de CMD 2

Extrudat CMD 2	MS %	FI % MS	Cellulose % FI (% MS)	Hémicelluloses % FI (% MS)	Lignines % FI (% MS)
E1	44,2	74,8	56,3 (42,1)	35,2 (26,3)	8,6 (6,4)
E2	43,7	73,2	56,1 (41,1)	34,6 (25,3)	9,3 (6,8)
E3	45,8	74,5	58,4 (43,5)	35,3 (26,3)	6,2 (4,6)
<b>Moyenne</b>	<b>44,6</b>	<b>74,2</b>	<b>57 (42,2)</b>	<b>35 (26)</b>	<b>8 (5,9)</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3 (1,2)</b>	<b>0,4 (0,6)</b>	<b>1,6 (1,2)</b>

FI : Fibre Insoluble ; MS : Matière Sèche

**Tableau 3.2** Composition des extrudats obtenus de différentes expériences de bioextrusion en employant le lot de CMD 3

	MS %	FI %MS	Cellulose % FI (% MS)	Hémicelluloses % FI (% MS)	Lignines % FI (% MS)
E4	37,9	76,6	46,3 (35,5)	47,9 (36,7)	5,6 (4,3)
E5	37,1	77,2	47,9 (37)	45,2 (34,9)	7,0 (5,4)
E6	38,0	76,5	49,7 (38)	45,4 (34,7)	4,9 (3,7)
E7	34,2	73,6	49,2 (36,2)	46,2 (34)	4,5 (3,3)
E8	37,1	73,8	45,4 (33,5)	50 (36,9)	4,7 (3,4)
E9	36,4	74	50,5 (37,4)	46,3 (34,3)	3,2 (2,4)
E10	34,6	75	47,5 (35)	47,5 (35,4)	4,9 (3,7)
E11	33,6	69	52,5 (36)	42,2 (29,3)	5,3 (3,7)
<b>Moyenne</b>	<b>36,1</b>	<b>74,4</b>	<b>48,6 (36,2)</b>	<b>46,3 (34,5)</b>	<b>5 (3,7)</b>
<b>Ecart type</b>	<b>1,6</b>	<b>2,3</b>	<b>2,2 (1,3)</b>	<b>2,1 (2,2)</b>	<b>1 (0,8)</b>

FI : Fibre Insoluble ; MS : Matière Sèche

### 3.3.1.2 Modification de la teneur en eau au cours de la bioextrusion

Le ratio liquide/solide est un des facteurs affectant le traitement de la matière lignocellulosique en extrusion (Duque et al., 2017). De plus, lorsqu'il s'agit d'utiliser des enzymes, le contenu d'eau dans le milieu est un facteur crucial pour la progression des enzymes et donc la mise en contact avec leur substrat (Paës et al., 2013). Pour cette raison au cours de l'étape d'imprégnation enzymatique, le ratio liquide/solide a été modifié par dilution des enzymes dans du tampon citrate-phosphate avant introduction dans l'extrudeur (**Tableau 3.3**). La teneur en eau dans le milieu lors de la bioextrusion est calculée à partir de la matière sèche du bioextrudat obtenu en sortie d'extrudeur. La charge enzymatique a été maintenue entre 12 et 15g de protéine par Kg d'extrudat sec

**Tableau 3.3** Conditions d'extrusion et bioextrusion lors de la modification du ratio L/S enz

Essai		1	2	3	4	5	6
Ss	rpm	300	300	300	300	300	300
Courant moteur	%	7,3	7,1	7,1	7,4	7,9	7
EMS	W.h/Kg de CMD sec	360	350,5	348,3	365	390	346,3
QS	kg/h	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
QNaOH	kg/h	1,65	1,75	1,65	1,65	1,66	1,65
[NaOH]	%	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
TP1	°C	123	128	123	123	129	122
NaOH/MS	%	5,9	6,4	5,9	5,9	6	5,9
QH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kg/h	5,75	5,95	5,75	5,75	5,75	5,75
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Qext	Kg/h	3,3	3,91	3,2	3,3	3,01	3
MS ext	%	37,7	35,9	38,3	40,6	39,6	38,9
Qfil	Kg/h	6,1	5,44	6,11	6,06	6,08	5,92
MS fil	%	8,5	9,4	8,5	8,5	8,2	8,5
Qsol enz	Kg/h	0,1	1,14	1,4	2,3	2,86	3,7
Q bioext	Kg/h	3,4	5,06	4,7	5,6	5,87	6,8
MS bioext	%	37,9	28,9	27,8	25,2	21,4	18,7
<b>Teneur en eau</b>	<b>%</b>	<b>62,1</b>	<b>71,1</b>	<b>72,2</b>	<b>74,8</b>	<b>78,6</b>	<b>81,3</b>
TP 2	°C	52	47	52	52	52	52
L/Sb	kg/kg	1	1	1	1	1	1
L/Sa	kg/kg	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
<b>L/Sez</b>	<b>kg/kg</b>	<b>1,4</b>	<b>2,5</b>	<b>2,3</b>	<b>3</b>	<b>3,7</b>	<b>4</b>
Charge de cellulase	FPU/g ext sec	7	7	8	6	6	7
	FPU/g C ext	19	19	21	18	16	21
Charge de xylanase totale	IU/g ext sec	573	570	637	550	474	623
	IU/g H ext	1495	1672	1663	1435	1459	1625
<b>Charge de protéine totale</b>	<b>g/Kg d'extrudat sec</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>15</b>

Note : Ss : vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit CMD ; QNaOH,, QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et Qsol enz: Débit des solutions de NaOH, de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de solution enzymatique respectivement ; [NaOH] : concentration de la solution en NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivement ; NaOH/MS : ratio de NaOH par matière sèche de CMD ; TP1 et TP2 correspondent aux températures moyennes mesurées par les sondes de température 1 et 2 (voir figure 3.1) ; Qext, Qfil et Q bioext : Débits de extrudat, filtrat et bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : taux de matière sèche de l'extrudat, filtrat et bioextrudat ; L/Sb, L/Sa et L/Sez : Ratios Liquide/Solide pour le phases de prétraitement alcalin, neutralisation et bioextrusion. FPU : Filter paper Units ; UI : Unité Internationale ; C ext : Cellulose contenue dans l'extrudat ; H ext : Hémicelluloses contenues dans l'extrudat

L'analyse de la composition des bioextrudats permet d'étudier la composition de la fibre insoluble après bioextrusion et de calculer les indicateurs massiques (**Tableau 3.4**). L'augmentation du ratio L/S lors de l'introduction des enzymes (L/S enz) augmente la teneur en eau dans la zone de bioextrusion de l'extrudeur (modules 7 à 10). Cette dilution du milieu par un plus grand apport d'eau favorise principalement la solubilisation des hémicelluloses, ce qui se traduit par un enrichissement en cellulose

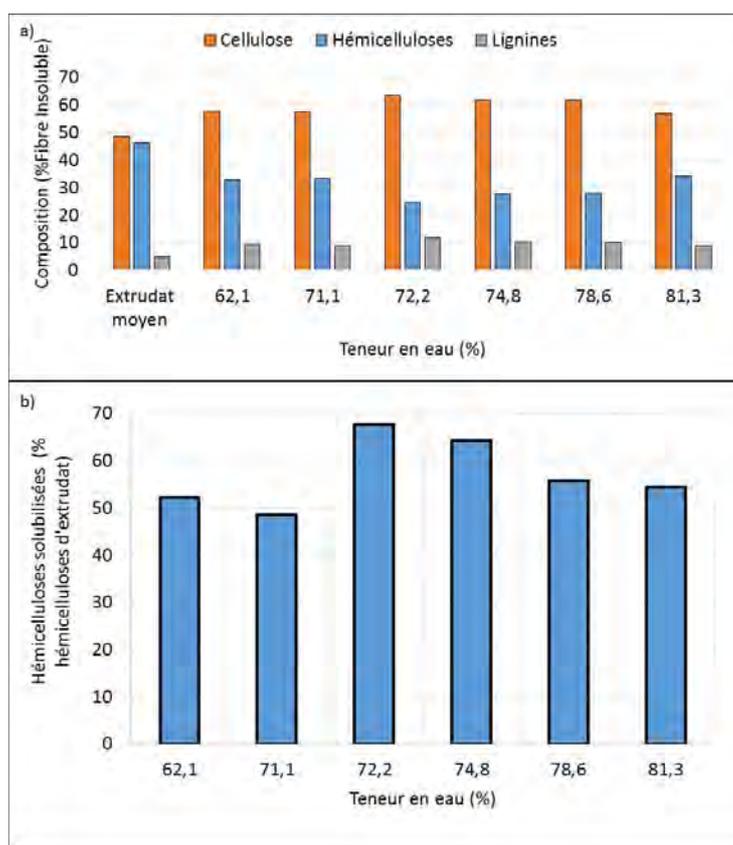
dans la fibre insoluble résiduelle des bioextrudats (**Figure 3.5a**), la proportion de lignines ne varie pas. Au bilan massique, pour un ratio L/S enz de 1,4, plus de la moitié des hémicelluloses encore présentes dans l'extrudat de prétraitement sont solubilisées, avec 13% de la cellulose et une perte en fibre insoluble de 30%. Ce qui confirme l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides de structure de la fibre lors de la bioextrusion. L'augmentation du ratio L/S à l'introduction des enzymes favorise cette déconstruction qui atteint près de 70% des hémicelluloses pour une teneur en eau du mélange de 73% (**Figure 3.5b**). Le rendement en cellulose solubilisée restant limitée à moins de 20%. Cependant, au-delà de 75% d'eau dans le mélange, l'hydrolyse des hémicelluloses ne semble plus favorisée. Il est à remarquer que le moindre rendement en hémicelluloses et surtout en cellulose solubilisée (respectivement 56% et 7%) obtenu pour le ratio L/S enz de 3,7 (78,6% de teneur en eau) pourrait s'expliquer par la diminution de la charge protéique enzymatique (12 g/Kg). Néanmoins, pour une teneur en eau supérieur (81,3%) et une charge enzymatique plus élevée (15g/Kg), la diminution du rendement en hémicelluloses solubilisées est confirmée (54%).

Cet effet de la dilution par l'eau du mélange lors de l'introduction des enzymes sur la solubilisation des hémicelluloses pourrait s'expliquer par une amélioration des échanges et de la diffusion des enzymes jusqu'à leur substrat. En sortie de l'étape de pressage/filtration du prétraitement, le mélange solide/liquide est à 62% d'eau et l'introduction de l'enzyme en solution dans le tampon citrate-phosphate se fait avec un très faible apport d'eau dans le cas du rapport L/S enz de 1,4 (teneur en eau du mélange avec les enzymes de 62%). Dans la fibre prétraitée en milieu alcalin, les hémicelluloses sont les plus accessibles, mais la plus forte concentration en xylanases dans le milieu pourrait être un facteur limitant à leur diffusion dans le solide et à leur adsorption sur les chaînes de xylane. La dilution du mélange par un apport d'eau plus élevé à ratio L/S enz de 2 à 3, bien qu'elle diminue la concentration en enzyme dans la phase aqueuse, permettrait d'augmenter la mobilité des enzymes (Jørgensen et al., 2007), de minimiser les effets de limitation diffusionnelle, et réduire l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse, liée à la solubilisation des hémicelluloses dans la phase solide. Cependant, au-delà d'un taux d'hydratation de 75% (L/S enz > 3), la dilution des enzymes dans la phase aqueuse serait plus favorable à leur distribution à l'extérieur de la matière solide, ce qui sera défavorable à leur efficacité catalytique. La solubilisation de la cellulose apparaît moins sensible à cet effet de dilution, mais plutôt à la charge en cellulase.

**Tableau 3.4** Composition et indicateurs des bilans massiques des bioextrudats lors de la modification du ratio L/S enz en employant le lot de matière CMD 3

Echantillon	L/S enz	Teneur en eau	Composition				Indicateurs des bilans massiques		
			FI	C	H	L	FI solubilisée	Cellulose solubilisée	Hémicelluloses solubilisées
Unité	kg.kg-1/kg.kg-1	% (m/m)	%MS	%FI	%FI	%FI	% Fibre Insoluble de l'extrudat	% cellulose de l'extrudat	% Hémicelluloses de l'extrudat
Extrudat moyen			36,4	48,6	46,4	5,1			
1	1,4	62,1	51,5	57,8	32,9	9,2	30	13	52
2	2,5	71,1	50,1	57,6	33,4	8,9	29	17	49
3	2,3	72,2	45,5	63,6	24,9	11,8	38	15	68
4	3,0	74,8	44,9	61,9	27,7	10,4	38	18	64
5	3,7	78,6	52,3	61,9	27,8	10,2	28	7	56
6	4,1	81,3	45,5	56,8	34,2	8,9	36	22	54

FI :Fibre Insoluble ; C : Cellulose ; H : Hémicelluloses ; L : Lignines



**Figure 3.5** Composition de la fibre insoluble des bioextrudats et de l'extrudat (a) et hémicelluloses solubilisées d'après le bilan massique (b) lors de la modification de la teneur en eau de la phase de bioextrusion avec une charge enzymatique de autour de 14 g de protéine/Kg d'extrudat sec

### 3.3.1.3 Modification de la charge enzymatique au cours de la bioextrusion

La charge enzymatique constitue un facteur crucial pour l'hydrolyse de la biomasse, de ce fait son impact sur la bioextrusion a été évalué. Pour cela, la charge enzymatique a été modifiée de 14 à 36 g de protéine/ Kg d'extrudat sec, tout en conservant un ratio L/S enz proche de 2.3 et donc une teneur en eau du mélange de 70% (**Tableau 3.5**). La composition des bioextrudat en sortie d'extrudeur a été déterminée, et les bilans massiques pour 100 Kg d'extrudat sec ont été réalisés (**Tableau 3.5**).

**Tableau 3.5** Conditions d'extrusion et bioextrusion des expériences de modification de la charge enzymatique avec le lot de CMD 3

Essai		7	8	9
Ss	rpm	300	300	300
Courant moteur	%	7	7	7
EMS	W.h/Kg de CMD sec	351	337	325
QS	kg/h	1,8	1,8	1,8
QNaOH	kg/h	1,75	1,66	1,66
[NaOH]	%	5,9	5,9	5,9
TP1	°C	128	137	137
NaOH/MS	%	6,4	6,1	6,1
QH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kg/h	5,95	5,8	5,8
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,6	1,6	1,6
Qext	Kg/h	3,91	3,1	3,0
MS ext	%	35,9	38,4	36,9
Qfil	Kg/h	5,44	6,0	6,3
MS fil	%	9,4	8,8	8,8
Qsol enz	Kg/h	1,1	1,0	1,1
Q bioext	Kg/h	5,1	4,1	4,1
MS bioext	%	28	32	33
Teneur en eau	%	72	68	67
TP 2	°C	47	44	44
L/Sb	kg/kg	1	1	1
L/Sa	kg/kg	4,1	4,1	4,1
L/Sez	kg/kg	2,5	2,2	2,3
<b>Charge de cellulase</b>	<b>FPU/g ext sec</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
	<b>FPU/g C ext</b>	<b>19</b>	<b>31</b>	<b>36</b>
<b>Charge de xylanase totale</b>	<b>IU/g ext sec</b>	<b>570</b>	<b>1055</b>	<b>1522</b>
	<b>IU/g H ext</b>	<b>1672</b>	<b>2859</b>	<b>4126</b>
<b>Charge de protéine totale</b>	<b>g/Kg d'extrudat sec</b>	<b>14</b>	<b>26</b>	<b>36</b>

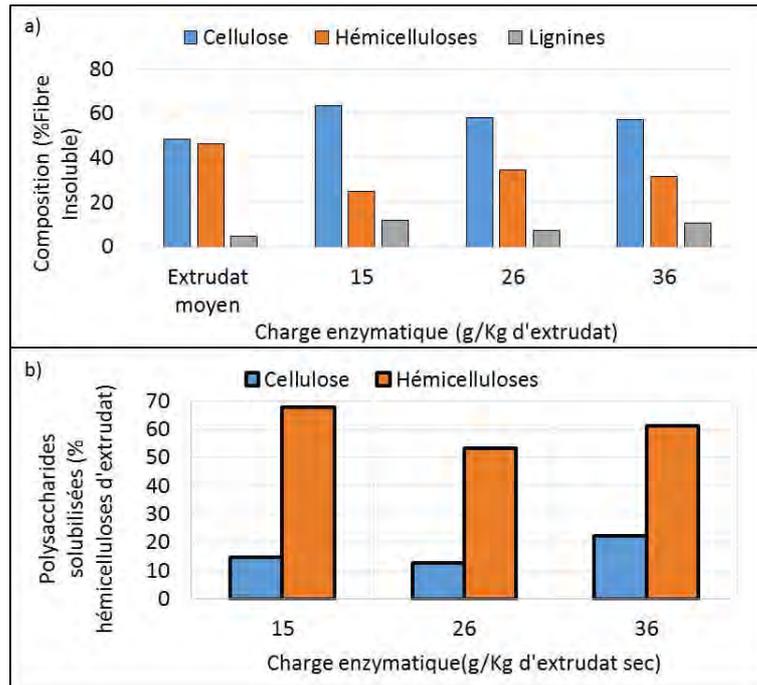
Note : Ss : vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit CMD ; QNaOH,, QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et Qsol enz: Débit des solutions de NaOH, de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de solution enzymatique respectivement ; [NaOH] : concentration de la solution en NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivement ; NaOH/MS : ratio de NaOH par matière sèche de CMD ; TP1 et TP2 correspondent aux températures moyennes mesurées par les sondes de température 1 et 2 (voir figure 3.1) ; Qext, Qfil et Q bioext : Débits de extrudat, filtrat et bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : taux de matière sèche de l'extrudat, filtrat et bioextrudat ; L/Sb, L/Sa et L/Sez : Ratios Liquide/Solide pour le phases de prétraitement alcalin, neutralisation et bioextrusion. FPU : Filter paper Unit ; UI : Unité Internationale ; C ext : Cellulose contenue dans l'extrudat ; H ext : Hémicelluloses contenues dans l'extrudat

A 2,5 de ratio L/S enz et une charge de prétraitement total de 14g/Kg d'extrudat sec les résultats de la bioextrusion sont confirmés : 67,6% d'hémicelluloses solubilisées pour 15% de la cellulose solubilisée. Dans les conditions employées de bioextrusion, les résultats de composition de la fibre insoluble des bioextrudats indiquent une diminution de la fraction en hémicelluloses (**Tableau 3.6** et **Figure 3.6a**). L'augmentation de la charge enzymatique induit aussi une diminution de la fraction de cellulose dans la fibre insoluble. Les résultats du bilan massique confirment une augmentation de la solubilisation de la cellulose induite par la charge enzymatique, cependant la solubilisation des hémicelluloses est plus élevée à une charge enzymatique faible (**Figure 3.6b**). D'après Gatt (2019), la charge enzymatique appliquée en bioextrusion a un impact plus important sur l'hydrolyse enzymatique en glucose, cette différence serait en partie due à une activité plus importante en cellulases que des hémicelluloses dans le cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 (Gatt, 2019). Mais l'augmentation de la charge enzymatique favorise l'hydrolyse de la cellulose, tandis que celle des hémicelluloses serait influencée davantage par la modification du ratio L/S.

**Tableau 3.6** Composition et indicateurs des bilans massiques des bioextrudats obtenus par modifications de la charge enzymatique à un ratio L/S enz de 2.3 avec le lot de CMD 3

Echantillon	Charge enzymatique  g de protéine/Kg d'extrudat sec	Composition				Indicateurs des bilans massiques		
		FI	C	H	L	Fibre Insoluble retirée % Fibre Insoluble de l'extrudat	Cellulose retirée % cellulose de l'extrudat	Hémicelluloses retirées % Hémicelluloses de l'extrudat
Extrudat moyen		36,1	48,6	46,3	5			
1'	15	45,5	63,6	24,9	11,8	38	15	67,6
2'	26	45,5	58,2	34,5	7,3	31,9	12,8	53,2
3'	36	37,4	57,3	31,7	10,9	38,5	22,4	61,2

FI : Fibre Insoluble ; C : Cellulose ; H : Hémicelluloses ; L : Lignines



**Figure 3.6** Composition de la fibre insoluble des bioextrudats et de l'extrudat (a) et hémicelluloses retirées d'après le bilan massique (b) lors de la modification de la charge enzymatique avec un ratio L/S de 2,3

### 3.3.1.4 Conclusion et discussion

L'ensemble des résultats obtenus mettent clairement en évidence l'activité enzymatique des enzymes pendant l'étape de bioextrusion comme indiqué par les études réalisées précédemment (Vandenbossche et al., 2015). La combinaison de l'action thermomécanique en milieu solide concentré et hydrolytique des enzymes dans l'extrudeur bi-vis permet un fractionnement de la matière rapide, puis que le temps de résidence dans l'extrudeur est de quelques minutes. De façon schématique, 2 types de fractionnement au sens d'une déconstruction de la matière lignocellulosique sont produits pendant la bioextrusion : un fractionnement de type physique ou physicochimique, qui touche notamment les grosses particules de l'édifice fibreux et un biocatalytique qui concerne les particules plus fines et les assemblages polymoléculaires (Gatt, 2019). Très peu de sucre libres sont libérés après sortie de bioextrusion, mais l'action des enzymes dépolymérise partiellement la cellulose (15 à 20%) et surtout les hémicelluloses (jusqu'à 70%). Ainsi la bioextrusion peut favoriser la production de sucres lorsque la saccharification est poursuivie en phase concentrée dans un réacteur adapté. La prochaine partie de ce chapitre, s'attache sur l'étude des facteurs de bioextrusion sur l'hydrolyse enzymatique en réacteur fermé de saccharification après bioextrusion.

### 3.3.2 Influence des conditions de bioextrusion sur l'hydrolyse enzymatique des bioextrudats

Les facteurs de production de la matière imprégnée ont une influence sur la libération des sucres pendant l'étape de bioextrusion. Cependant, l'hydrolyse enzymatique en extrudeur et en réacteur fermé peuvent avoir des comportements différents (Gatt, 2019). Dans cette partie du chapitre, l'hydrolyse enzymatique des bioextrudats obtenus en modifiant la charge enzymatique et le ratio L/S de la phase d'imprégnation ont été poursuivies dans un réacteur de saccharification adapté (Tornado™ ou agitateur orbital). Les hydrolyses ont été réalisées à une consistance de 20% (m/m), raison pour laquelle lorsque la matière sèche des bioextrudats en sortie d'extrudeur était supérieur à cette valeur, le milieu a été complété avec du tampon citrate-phosphate. D'après Jørgensen et al (2007), cette consistance constitue la limite haute à laquelle la saccharification est optimale à échelle pilote (Jørgensen et al., 2007; Tolan, 2002).

#### 3.3.2.1 Influence du ratio L/S enz sur la cinétique d'hydrolyse des bioextrudats

La modification du ratio Liquide/Solide par l'étape de bioextrusion du coproduit de maïs doux (CMD lot 3) est étudiée en introduisant la solution du cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 (90%) - NS22002 (10%) non dilué (L/S=1,4, teneur en eau du bioextrudat de 62%), puis dilué dans le tampon citrate-phosphate 0,5M (pH 5) de 10, 15 et 40 fois (L/S enz=2,3 ; 3 et 4, teneur en eau des bioextrudats de 72,2, 74,8 et 81,3% respectivement). Le débit de solution enzymatique est adapté de façon à obtenir une charge enzymatique équivalente à chaque essai (14 à 16 de charge enzymatique en protéines totales/Kg d'extrudat sec) (**Tableau 3.7**). Les bioextrudats obtenus sont caractérisés et l'hydrolyse est poursuivie en réacteur de saccharification.

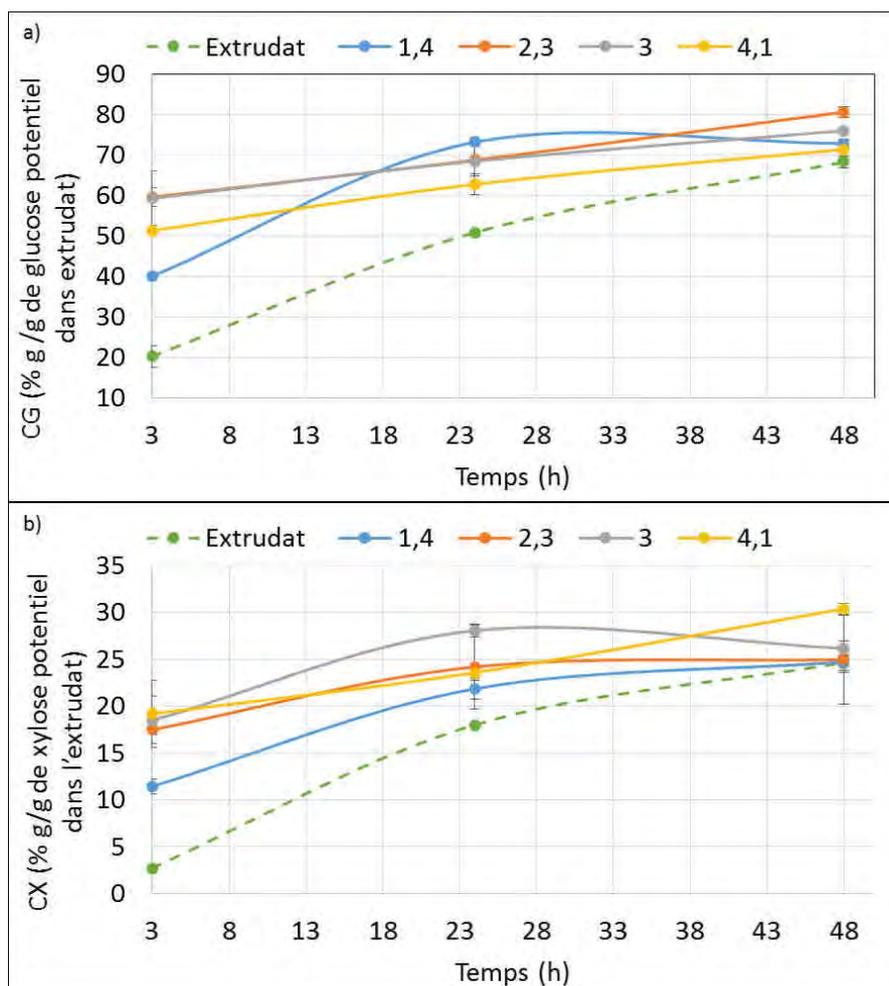
Il apparaît clairement que la bioextrusion permet une meilleure libération du glucose à des temps précoces de la saccharification (**Figure 3.7a**): au bout de 3h de temps de contact dans le réacteur agité à 20% de consistance, le taux de glucose libéré CG est de 40% pour le ratio L/S de 1,4, 60% pour le ratio L/S de 2,3 à 3, et de 50% pour le ratio maximum de 4,1, supérieur de 20 à 40% à celui obtenu pour un extrudat prétraité en extrudeur, après ajout d'une charge enzymatique équivalente dans le réacteur de saccharification. Ce qui confirme l'effet positif de la bioextrusion sur l'accessibilité de la cellulose aux cellulases accélérant ainsi sa saccharification en glucose. Elle apparaît directement liée à la proportion d'hémicelluloses solubilisées au cours de la bioextrusion, plus qu'à celle de la cellulose : le maximum de rendement en glucose libéré au bout de 3h (60%) est obtenu pour les ratios L/S enz 2,3 et 3 pour lesquels le rendement d'hémicelluloses solubilisés est de 60% à l'issue de la bioextrusion. Et pour les ratios L/S enz plus faibles (1,4) et plus élevés (4,1) pour lesquels moins d'hémicelluloses ont été solubilisés (respectivement 52 et 55%), leur taux de conversion en glucose au bout de 3h sont plus faibles (respectivement 40 et 50%). La présence des hémicelluloses libérés ne pénalise pas la

saccharification de la cellulose dans le réacteur agité à 20% de consistance initiale (60 à 70% de glucose libéré des bioextrudats au bout de 24h pour 50% à partir de l'extrudat, et le maximum de rendement de 80% est atteint au bout de 48h pour le bioextrudat alors qu'il plafonne à 60% pour l'extrudat. L'effet de la bioextrusion sur l'hydrolyse des hémicelluloses et leur saccharification se retrouve aussi sur la cinétique de libération du xylose (**Figure 3.7b**), mais dans une moindre proportion. Le rendement en xylose atteint 10 à 20% au bout de 3h à partir des bioextrudats, d'autant plus élevé que le ratio L/S enz est plus fort, alors qu'il n'est que quelques pourcents à partir de l'extrudat. Cependant, la saccharification des hémicelluloses des bioextrudats par les hémicellulases présentes dans le milieu plafonne à 30%, même au bout de 48h, très proche de celle obtenue à partir de l'extrudat (25%). Bien qu'une partie importante (50 à 70%) des hémicelluloses des bioextrudats soient solubilisées, l'activité des hémicellulases pour l'hydrolyse semble limitée. Une explication à ce phénomène pourrait être la faible proportion de ces enzymes dans le cocktail mis en œuvre par rapport à la quantité d'hémicellulases présentes dans le milieu bioextrudé.

**Tableau 3.7** Conditions d'extrusion et de bioextrusion utilisées pour étudier l'impact du ratio L/S enz en bioextrusion sur la saccharification avec le CMD 3

Essai		10	11	12	13
Ss	rpm	300	300	300	300
Courant moteur	%	7,3	7,1	7,4	7
EMS	W.h/Kg	360	348,3	365	346,3
QS	kg/h	1,8	1,8	1,8	1,8
QNaOH	kg/h	1,65	1,65	1,65	1,65
[NaOH]	%	5,9	5,9	5,9	5,9
TP1	°C	123	123	123	122
NaOH/MS	%	5,9	5,9	5,9	5,9
QH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kg/h	5,75	5,75	5,75	5,75
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,6	1,6	1,6	1,6
Qext	Kg/h	3,3	3,2	3,3	3
MS ext	%	37,7	38,3	40,6	38,9
Qfil	Kg/h	6,1	6,11	6,06	5,92
MS fil	%	8,5	8,5	8,5	8,5
<b>Qsol enz</b>	<b>Kg/h</b>	<b>0,1</b>	<b>1,4</b>	<b>2,3</b>	<b>3,7</b>
<b>Q bioext</b>	<b>Kg/h</b>	<b>3,4</b>	<b>4,7</b>	<b>5,6</b>	<b>6,8</b>
<b>MS bioext</b>	<b>%</b>	<b>37,9</b>	<b>27,8</b>	<b>25,2</b>	<b>18,7</b>
TP 2	°C	52	52	52	52
L/Sb	kg/kg	1	1	1	1
L/Sa	kg/kg	4,1	4,1	4,1	4,1
<b>L/Sez</b>	<b>kg/kg</b>	<b>1,4</b>	<b>2,3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Charge de cellulase	FPU/g ext sec	7	8	6	7
	FPU/g C ext	19	21	18	21
Charge de xylanase totale	IU/g ext sec	573	637	550	623
	IU/g H ext	1495	1663	1435	1625
Charge de protéine totale	g/Kg d'extrudat sec	14	16	14	15

Note : Ss : vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit CMD ; QNaOH, QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et Qsol enz : Débit des solutions de NaOH, de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de solution enzymatique respectivement ; [NaOH] : concentration de la solution en NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivement ; NaOH/MS : ratio de NaOH par matière sèche de CMD ; TP1 et TP2 correspondent aux températures moyennes mesurées par les sondes de température 1 et 2 (voir figure 3.1) ; Qext, Qfil et Q bioext : Débits de extrudat, filtrat et bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : taux de matière sèche de l'extrudat, filtrat et bioextrudat ; L/Sb, L/Sa et L/Sez : Ratios Liquide/Solide pour les phases de prétraitement alcalin, neutralisation et bioextrusion. FPU : Filter paper Units ; UI : Unité Internationale ; C ext : Cellulose contenue dans l'extrudat ; H ext : Hémicelluloses contenues dans l'extrudat



**Figure 3.7** Taux de conversion en glucose (CG) (a) et en xylose (CX) (b) des bioextrudats obtenus à différents ratios L/S enz de bioextrusion (trait plein) et de l'extrudat (trait en pointillés) après sortie de l'extrudeur

### 3.3.2.2 Influence de la charge enzymatique sur la cinétique d'hydrolyse des bioextrudats

L'influence de la charge enzymatique pour l'étape de bioextrusion du coproduit de maïs doux (CMD lot 3) est étudiée en introduisant des solutions du cocktail enzymatique Cellic Ctec 2, pourvoyeur de cellulases, plus au moins enrichies en xylanases par l'intermédiaire du cocktail NS22002 (**Tableau 3.8**).

**Tableau 3.8** Conditions d'extrusion et bioextrusion lors de la modification de la charge en xylanase en employant le lot de CMD 3

Essai		14	15	16	17	18
Ss	rpm	300	300	300	300	300
Courant moteur	%	6,4	6,6	6,6	6,8	6,6
EMS	W.h/Kg	317	326	327	337	325
QS	kg/h	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
QNaOH	kg/h	1,66	1,7	1,66	1,66	1,66
[NaOH]	%	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
TP1	°C	137	128,0	137	137	137
NaOH/MS	%	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
QH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kg/h	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Qext	Kg/h	3,0	3,1	3,2	3,1	3,0
<b>MS ext</b>	<b>%</b>	<b>37,5</b>	<b>37,7</b>	<b>37,5</b>	<b>38,4</b>	<b>36,9</b>
Qfil	Kg/h	6,2	5,9	6,0	6,0	6,3
MS fil	%	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8
<b>Qsol enz</b>	<b>Kg/h</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>
<b>Q bioext</b>	<b>Kg/h</b>	<b>4,0</b>	<b>4,1</b>	<b>4,2</b>	<b>4,1</b>	<b>4,1</b>
<b>MS bioext</b>	<b>%</b>	<b>29,8</b>	<b>30,6</b>	<b>31,9</b>	<b>31,9</b>	<b>32,9</b>
TP 2	°C	44	44,0	44	44	44
L/Sb	kg/kg	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
L/Sa	kg/kg	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
L/Sez	kg/kg	2,6	1,9	2,3	2,2	2,3
<b>Charge de cellulase</b>	<b>FPU/g ext sec</b>	16	11	11	11	12
	<b>FPU/g C ext</b>	48	32	31	31	36
<b>Charge de xylanase totale</b>	<b>UI/g ext sec</b>	1365	917	960	1055	1522
	<b>UI/g H ext</b>	3701	2485	2603	2859	4126
<b>Charge xylanase NS</b>	<b>UI/g d'ext</b>	0	0	84	171	505
<b>Charge de protéine totale</b>	<b>g/Kg d'extrudat sec</b>	34	23	24	26	36

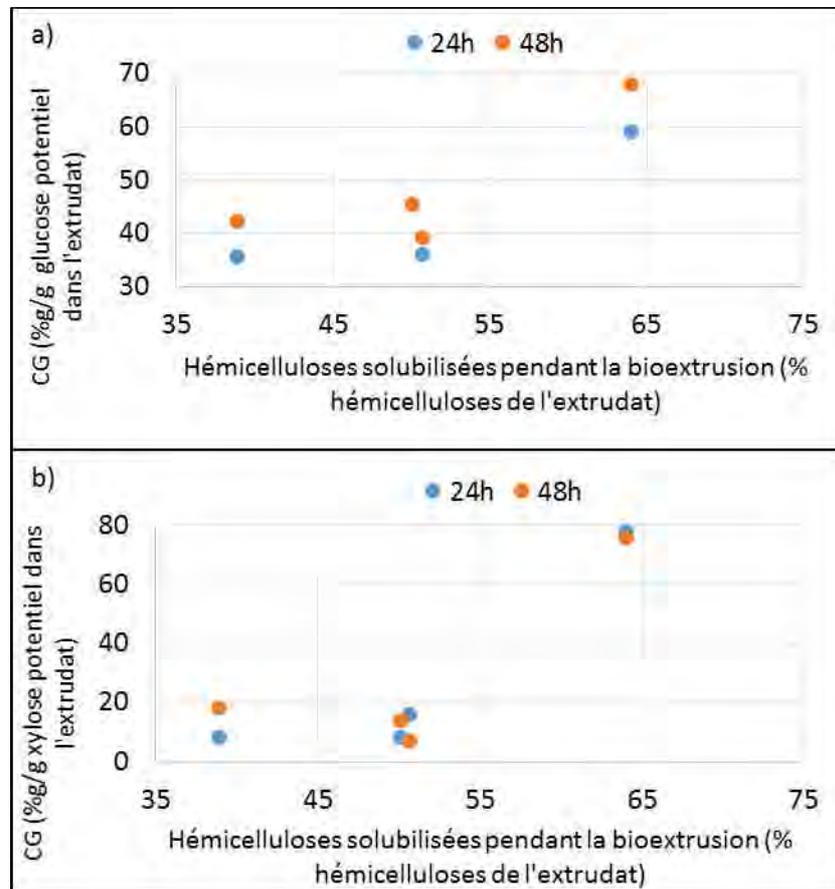
Note : Ss : vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit CMD ; QNaOH,, QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et Qsol enz: Débit des solutions de NaOH, de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de solution enzymatique respectivement ; [NaOH] : concentration de la solution en NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivement ; NaOH/MS : ratio de NaOH par matière sèche de CMD ; TP1 et TP2 correspondent aux températures moyennes mesurées par les sondes de température 1 et 2 (voir figure 3.1) ; Qext, Qfil et Q bioext : Débits de extrudat, filtrat et bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : taux de matière sèche de l'extrudat, filtrat et bioextrudat ; L/Sb, L/Sa et L/Sez : Ratios Liquide/Solide pour le phases de prétraitement alcalin, neutralisation et bioextrusion; FPU : Filter paper Units ; UI : Unité Internationale ; C ext : Cellulose contenue dans l'extrudat ; H ext : Hémicelluloses contenues dans l'extrudat

L'augmentation de la charge enzymatique en charge enzymatique de cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 (90%)-NS22002 (10%) dans le réacteur de saccharification de l'extrudat (**Figure 3.9**) confirme bien l'effet attendu d'une augmentation des rendements en glucose avec la charge enzymatique en cellulase (**Figure 3.9a**) et du rendement en xylose avec la charge en xylanase (**Figure 3.9b**). Par contre

dans le cas du bioextrudat, si l'augmentation de la conversion en glucose et xylose au bout de 24h dans le réacteur de saccharification est bien confirmé par rapport à celle de l'extrudat, l'effet d'une augmentation de la charge en cellulase est moins net (**Figure 3.9a**): le taux de conversion en glucose est inférieur au bout de 24h pour une charge élevée en cellulase (16 FPU/g d'extrudat sec), et équivalent au bout de 68h à celui obtenu avec une charge faible (11FPU/g d'extrudat sec). L'apport en xylanase modifie peu les taux de conversion en xylose au bout de 24h, voisins de 30%, mais semble les améliorer au temps long de saccharification (68h) sans pour autant se poursuivre significativement au-delà (96h)(**Figure 3.9b**). Il est à remarquer que les meilleurs taux de conversion en glucose libérés (80 et 83%) sont obtenus pour les apports en xylanases les plus élevées par ajout d'une plus forte proportion de cocktail NS22002 assurant une saccharification plus poussée des hémicelluloses. Ces résultats suggèrent les hypothèses suivantes :

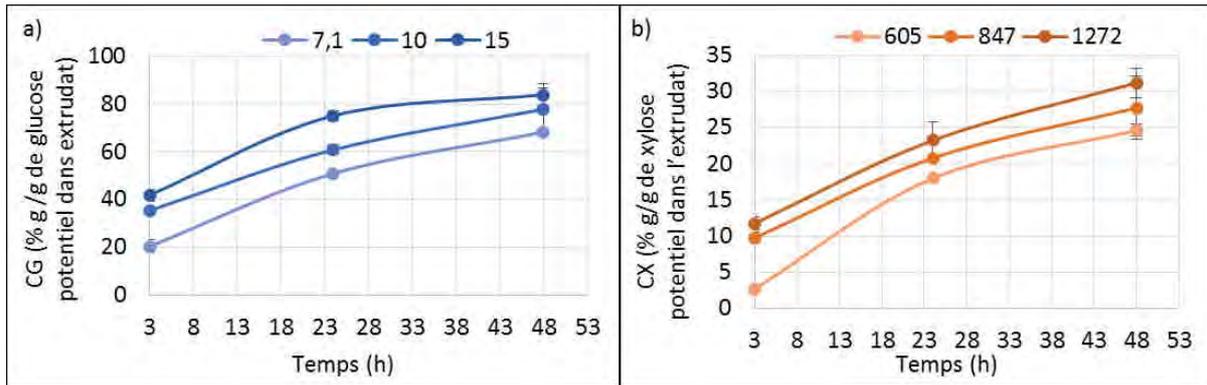
- la bioextrusion avec introduction de la charge enzymatique dans l'extrudat favorise la diffusion des enzymes cellulo et hémicellulolytiques à l'intérieur du solide déjà déstructuré partiellement par le prétraitement. Il en résulte, dans le bioextrudat obtenu en sortie d'extrudeur, une solubilisation partielle des hémicelluloses qui ne font plus barrière à la diffusion des cellulases dans le solide fibreux et ne concurrencent plus l'absorption et l'action catalytique d'hydrolyse de la cellulose. La saccharification de la cellulose de la fibre insoluble, ainsi enrichie en ce substrat (à 58,2% de cellulose à 34,5% d'hémicelluloses résiduelles selon les conditions de prétraitement de la bioextrusion) est accélérée, conduisant à plus de glucose libéré rapidement (à 67% en 24h à 84% en 68h pour un maximum supérieur à 85% au bout de 96h). Ces performances correspondent à une solubilisation élevée des hémicelluloses lors de la bioextrusion (53%) et une charge en cellulose de 11 FPU/g de cellulose dans l'extrudat sec

- simultanément, les hémicelluloses solubilisées par la bioextrusion sont hydrolysées plus rapidement par les xylanases présentes dans le cocktail enzymatique qu'elles ne le seraient dans l'extrudat simplement prétraité. Et les meilleurs rendements en xylose libéré au bout de 24h, 68h et 98h respectivement à 28%, 41% et à 42%) sont aussi corrélés à la quantité d'hémicelluloses solubilisés, ce qui est cohérent avec leur meilleure accessibilité. Dans le cas du lot de CMD2, une solubilisation des hémicelluloses plus poussée (65%) a permis d'atteindre un taux de conversion en xylose important (80%) (**Figure 3.8**)

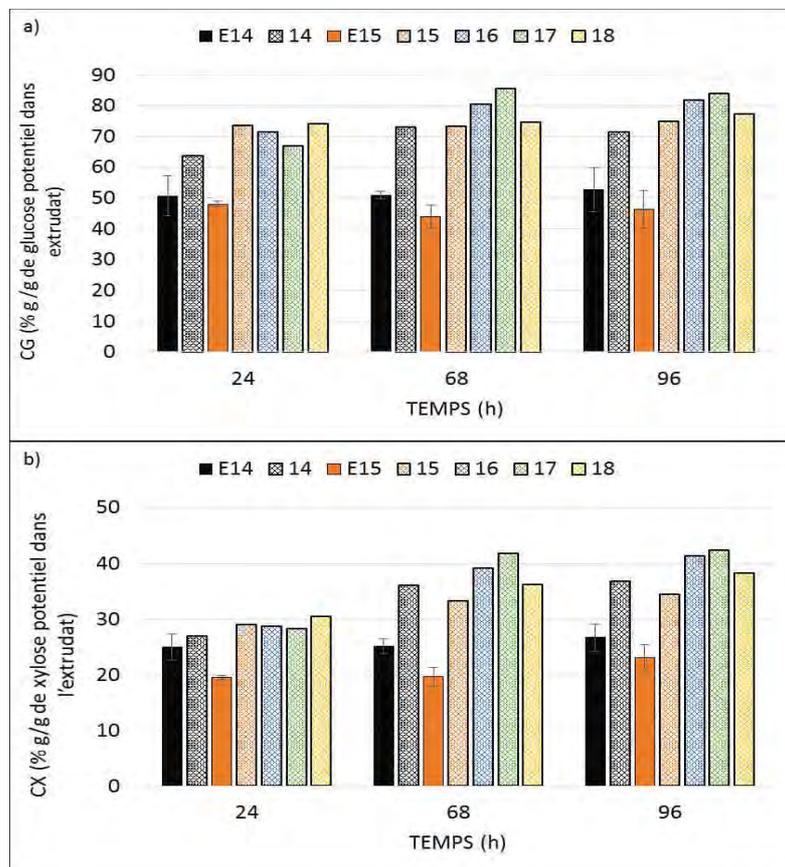


**Figure 3.8** Relation entre le taux de conversion en glucose (CG)(a) et le taux de conversion en xylose (CX)(b) à 24h et 48h avec le taux d'hémicelluloses solubilisées pendant la bioextrusion dans le cas de bioextrusion avec le lot de CMD 2

- Par contre, la fraction d'hémicelluloses résiduelles non solubilisées dans le bioextrudat, bien que minoritaire (moins de 50% des hémicelluloses de l'extrudat prétraité) demeure moins accessible aux xylanases, et leur hydrolyse en xylose reste limitée, même si l'hydrolyse de la cellulose par les cellulases au cours de la saccharification contribue à la libération par les xylanases du xylose des hémicelluloses encore associées à la fibre.



**Figure 3.9** Taux de conversion du glucose (CG)(a) en fonction de la charge en cellulase (7, 10 et 15 FPU/g d'extrudat sec) et du xylose (CX)(b) en fonction de la charge en xylanase (605, 847 et 1275 UI/g d'extrudat sec) obtenus par l'hydrolyse de l'extrudat obtenu par prétraitement du lot de CMD 3 à 20% de consistance



**Figure 3.10** Taux de conversion en glucose (CG)(a) et xylose (CX)(b) des bioextrudats obtenus par les essais 14 à 18 en agitateur orbital et de l'extrudat complétement en Cellic Ctec 2 avec la même charge enzymatique que le bioextrudat 14 (E14) et le bioextrudat 15 (E15) en système Tornado

Ces hypothèses sur le rôle des hémicelluloses dans la cinétique de saccharification de la cellulase semblent confirmées par les essais de bioextrusion menés sur le lot de CMD 2 à ratio L/S enz constant et la charge enzymatique croissante (**Tableau 3.9**). Ce lot se caractérise par une teneur en cellulose plus élevée (47%) et surtout une teneur en hémicelluloses plus faible (46%) dans la fibre insoluble, par comparaison avec celles du lot CMD 3 (42 et 54% respectivement)(**Tableau 3.10**). La fibre du lot 2 contient autant d'hémicelluloses que de celluloses ( $H/C=1$ ), alors que celle du lot 3 en contient près de 1,3 fois plus. Et le prétraitement alcalin dans les mêmes conditions opératoires en extrudeur bi-vis diminue encore plus ce ratio ( $H/C=0,6$ ), pour l'extrudat du lot 2, alors que la fibre prétraitée du lot 3 contient encore autant d'hémicelluloses que de cellulose ( $H/C=1$ ) (**Tableau 3.10**). Cette faible proportion d'hémicelluloses favorise la saccharification de la cellulose et des hémicelluloses de l'extrudat (**Tableau 3.9**), et la bioextrusion qui solubilise une partie des hémicelluloses (à 24%) pour en laisser que moins du tiers encore associé à la cellulose dans le bioextrudat ( $H/C=0,3$ ), permet une saccharification à 80% de taux de conversion en glucose et en xylose dès lors que la charge en cellulase et xylanase est suffisante ( 13 FPU/g d'extrudat sec et 1077 UI/g d'extrudat sec)(**Figure 3.12**).

**Tableau 3.9** Conditions d'extrusion et bioextrusion lors de la modification de la charge en xylanase en employant le lot de CMD 2 en employant le mélange Cellic Ctec 2 (90%) et NS22002 (10%)

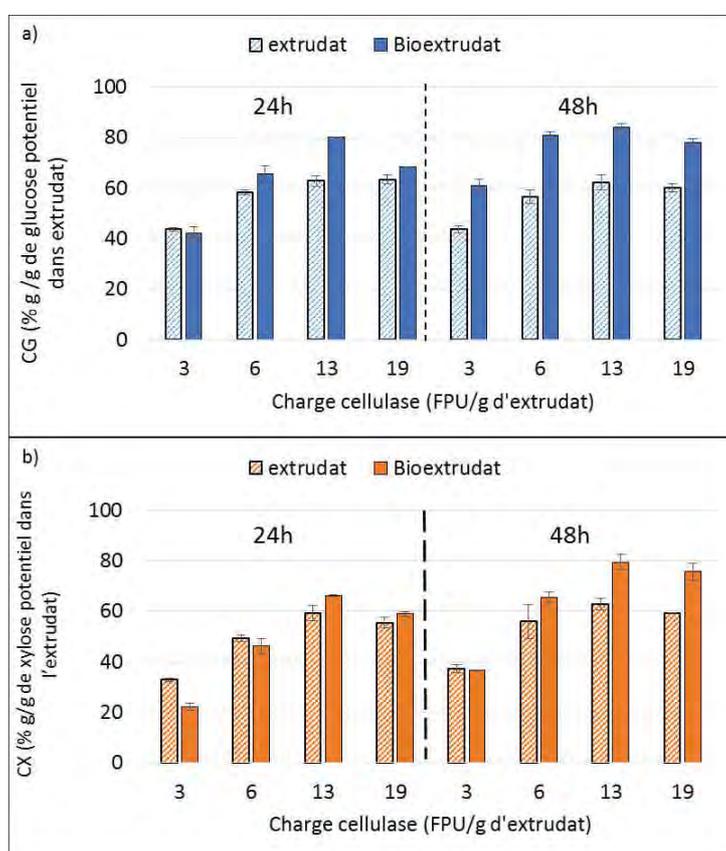
Essai		19	20	21	22
Ss	rpm	300	300	300	300
Courant moteur	%	9,6	9,5	9,7	9,6
$Q_s$		1,8	1,8	1,8	1,8
$Q_{NaOH}$	kg/h	1,62	1,62	1,62	1,62
[NaOH]	%	5,9	5,9	5,9	5,9
TP1	°C	123	123	123	123
NaOH/CMD sec	%	5,8	5,8	5,8	5,8
$Q_{H_2SO_4}$	kg/h	5,48	5,48	5,48	5,48
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,6	1,6	1,6	1,6
$Q_{ext}$	Kg/h	2,33	2,33	2,33	2,33
MS <sub>ext</sub>	%	42,91	42,91	42,91	42,91
$Q_{fil}$	Kg/h	6,23	6,35	6,29	6,31
MS <sub>fil</sub>	%	10,4	10,4	10,4	10,4
$Q_{sol\ enz}$	Kg/h	0,0	0,1	0,1	0,2
$Q_{bioext}$	Kg/h	2,71	2,51	2,64	2,53
MS <sub>bioext</sub>	%	43,3	44,3	46	44,4
TP 2	°C	49	49	49	49
L/S <sub>b</sub>	kg/kg	1,0	1,0	1,0	1,0
L/S <sub>a</sub>	kg/kg	3,9	3,9	3,9	3,9
L/S <sub>ez</sub>	kg/kg	1,2	1,2	1,2	1,2
<b>Charge de cellulase</b>	<b>FPU/g ext sec</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>19</b>
	<b>FPU/g C ext</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>44</b>
<b>Charge de xylanase totale</b>	<b>IU/g ext sec</b>	<b>254</b>	<b>531</b>	<b>1077</b>	<b>1577</b>
	<b>IU/g H ext</b>	<b>965</b>	<b>2019</b>	<b>4096</b>	<b>5997</b>
<b>Charge de protéine totale</b>	<b>g/Kg d'extrudat sec</b>	<b>6,2</b>	<b>13,0</b>	<b>26,4</b>	<b>38,6</b>

Note : Ss : vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit CMD ; QNaOH,, QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et Qsol enz: Débit des solutions de NaOH, de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de solution enzymatique respectivement ; [NaOH] : concentration de la solution en NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivement ; NaOH/MS : ratio de NaOH par matière sèche de CMD ; TP1 et TP2 correspondent aux températures moyennes mesurées par les sondes de température 1 et 2 (voir figure 3.1) ; Qext, Qfil et Q bioext : Débits de extrudat, filtrat et bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : taux de matière sèche de l'extrudat, filtrat et bioextrudat ; L/S<sub>b</sub>, L/S<sub>a</sub> et L/S<sub>ez</sub> : Ratios Liquide/Solide pour le phases de prétraitement alcalin, neutralisation et bioextrusion; FPU : Filter paper Units ; UI : Unité Internationale ; C ext : Cellulose contenue dans l'extrudat ; H ext : Hémicelluloses contenues dans l'extrudat

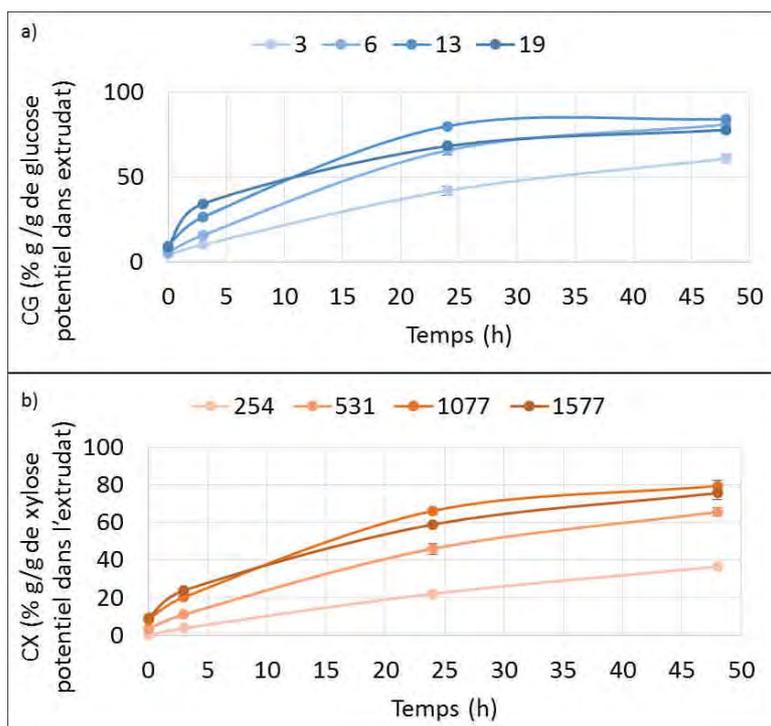
**Tableau 3.10** Composition du coproduit de maïs doux non traité, de l'extrudat et du bioextrudat (conditions proches) correspondant au lot 2 et lot 3

Matière	MS	FI %MS	Cellulose %FI	Hémicelluloses %FI	Lignines %FI	Ratio H/C
CMD lot 2	89,8	77	47	46	7	1,0
Extrudat CMD lot 2	44,6	74,2	57,0	35,0	8,0	0,6
Bioextrudat CMD lot 2 (L/S=1,4; Charge enz=11g prot /Kg)	33,8	51,9	72,8	24	3,2	0,3
CMD lot 3	89,5	76	42	54	4	1,3
Extrudat CMD lot 3	36,1	74,4	48,6	46,3	5	1,0
Bioextrudat CMD lot 3 (L/S=1,4; Charge enz=14g prot /Kg)	37,9	51,5	57,8	32,9	9,2	0,6

CMD : Coproduit de Maïs Doux ; L/S : ratio Liquide/Solide ; MS : Matière Sèche ; FI : Fibre Insoluble ; H/C : ratio Hémicelluloses/Cellulose ; Charge enz : Charge enzymatique ; prot : protéines



**Figure 3.11** Comparaison des taux de conversion en glucose (CG) (a) et en xylose (CX) (b) entre l'extrudat et le bioextrudat obtenus avec le CMD 2 à 24h et 48 d'hydrolyse enzymatique en réacteur orbital agité à 20% de consistance

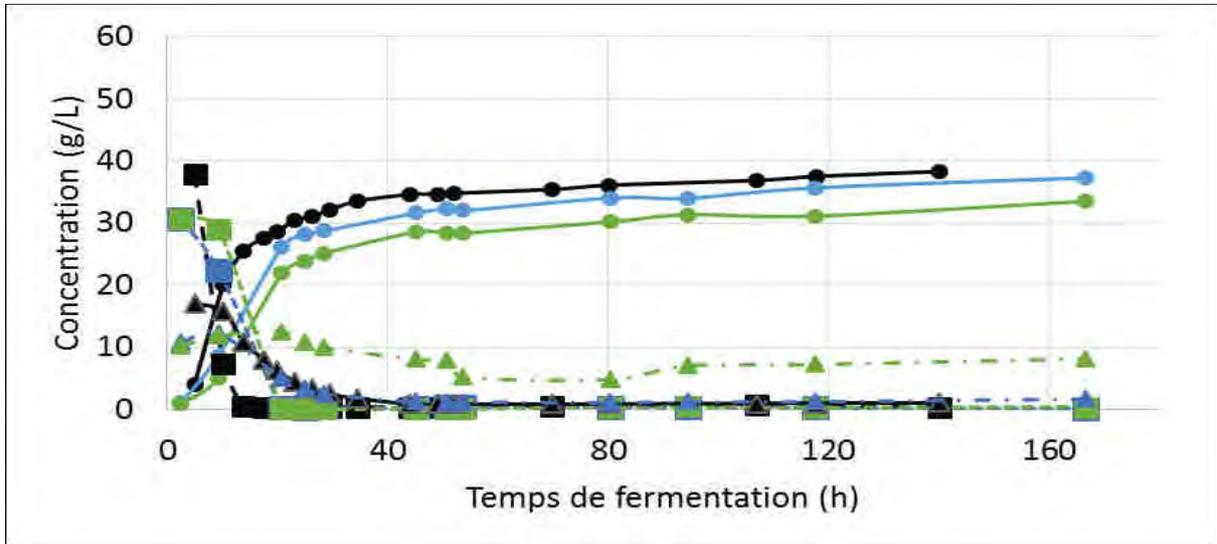


**Figure 3.12** Taux de conversion en glucose (CG) (a) et en xylose (CX)(b) à 20% de consistance en agitateur orbital en employant des charges en cellulase de 3, 6, 13 et 19 FPU/g d'extrudat et 254, 531, 1077 et 1577 UI/g d'extrudat sec et un ratio L/S enz de 1,4 pour la bioextrusion en employant le lot de CMD 2

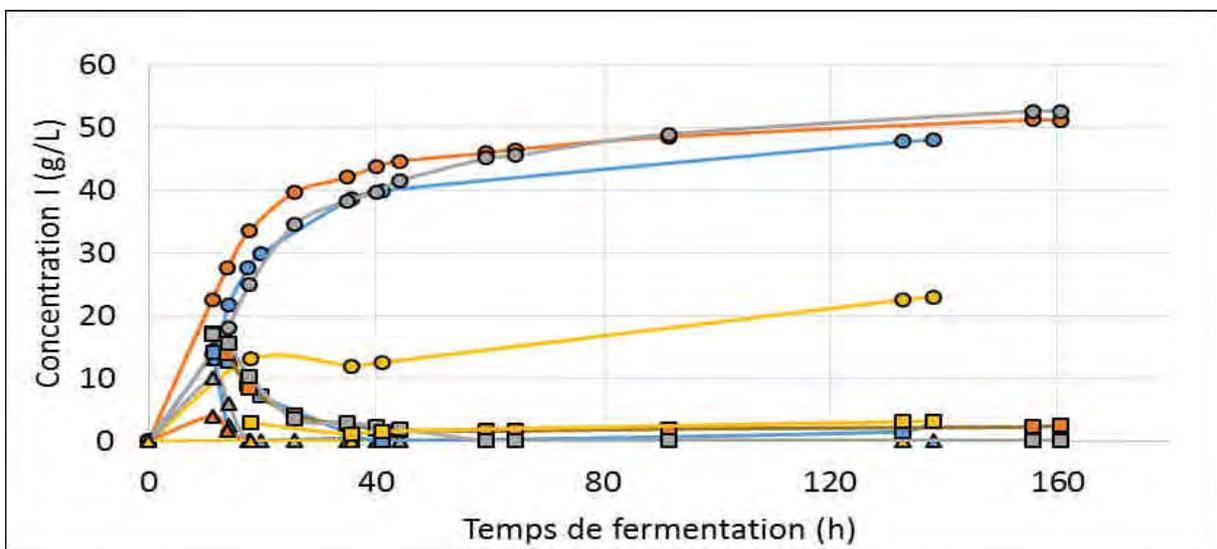
En conclusion, la bioextrusion d'une matière lignocellulosique comme le coproduit de maïs doux, combinant un prétraitement alcalin et l'imprégnation enzymatique par un mélange de cellulases et xylanases dans un extrudeur bi-vis peut être considérée comme une étape de prétraitement pour la destructuration efficace de l'édifice fibreux en vue de sa saccharification en glucose et xylose. Elle permet, pour des ratios de xylanase et de cellulase adaptés à la composition en hémicelluloses et cellulose de la fibre insoluble de solubiliser 50 à 75% des hémicelluloses par dépolymérisation partielle, en fonction du ratio L/S dans la zone d'imprégnation enzymatique, c'est-à-dire de la consistance du mélange (à 72% d'eau dans le solide). L'effet barrière des hémicelluloses vis-à-vis de la diffusion des cellulases et de leur activité hydrolytique de la cellulose est ainsi limitée, permettant une libération plus rapide du glucose lors de la saccharification en réacteur d'hydrolyse à consistance élevée (20% de la matière solide) et d'atteindre des rendements en glucose élevés (> 80%) au bout de 24h.

L'hydrolyse des hémicelluloses par les hémicellulases est ainsi favorisée probablement, surtout liée à leur solubilisation partielle; mais elle semble limitée lorsque le ratio hémicelluloses/cellulose initial est élevé. Cependant, cette libération rapide des sucres pendant la phase de saccharification permet d'envisager leur fermentation efficace dans le réacteur à haute consistance par introduction des levures adaptées, comme le montrent les résultats obtenus par le LISBP (INSA Toulouse) à partir de

bioextrudats (**Figure 3.13** et **Figure 3.14**). La libération du glucose dans le mélange en présence des levures permet sa conversion efficace en éthanol, celle du xylose libéré apparaît plus lente, voire limitée. C'est donc au couplage de la bioextrusion avec la saccharification/fermentation à une échelle pilote que nous nous sommes intéressés dans la dernière partie de ce chapitre.



**Figure 3.13** Concentration en éthanol (cercle), glucose (carrés) et xylose (triangles) lors de la SSCF des bioextrudats produits lors des essais 14 (noir), 15 (bleue) et 17 (vert) avec le lot de CMD 3 menées par l'INSAT à 20% de consistance et 30°C avec la levure Cellux 4



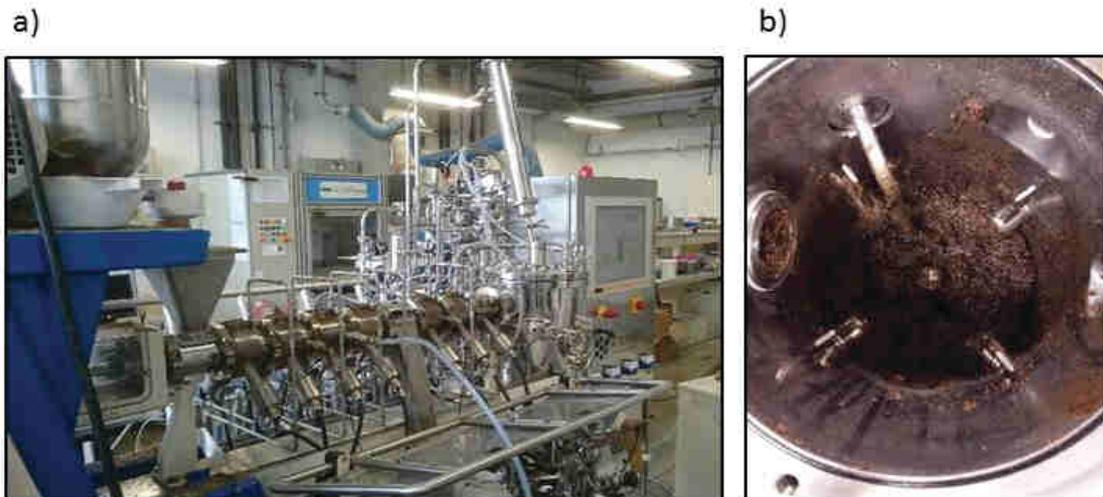
**Figure 3.14** Concentration en éthanol (cercle), glucose (carrés) et xylose (triangles) lors de la SSCF des bioextrudats produits lors des essais 19 (jaune), 20 (orange), 21 (gris) et 22 (bleue) à partir du CMD 2 menées par l'INSAT à 20% de consistance et 30°C avec la levure Cellux 4

### **3.3.3 Etude du couplage de la bioextrusion en extrudeur bi-vis avec la saccharification-fermentation des sucres en réacteur agité**

Les résultats recueillis sur l'impact des facteurs de bioextrusion lors de la saccharification en réacteur fermé indiquent la possibilité d'obtenir des rendements élevés en éthanol lors du processus de prétraitement-saccharification-fermentation. Néanmoins, ces résultats ont été menés dans des réacteurs de petite échelle et en récupérant le bioextrudat et le plaçant dans le réacteur de saccharification. Dans l'optique d'évaluer le procédé de manière continue, il est nécessaire d'étudier l'intégration de ces étapes avec le remplissage en continu d'un bioréacteur directement lié à l'extrudeur. Dans la littérature peu d'essais de ce niveau ont été réalisés (Boonchuay et al., 2018; Cha et al., 2015; Han et al., 2016), apportant ainsi des nouvelles perspectives sur un procédé intégré en continu.

#### **3.3.3.1 Description du bioréacteur de saccharification/fermentation**

Le bioréacteur mis en œuvre pour cette étude est un réacteur agité et thermostaté d'une capacité de 22 litres fourni par la société SOLARIS (France) et adapté pour les besoins de notre étude (cf. Chapitre 4, 4.4.6) : il est alimenté en bioextrudat produit dans l'extrudeur bi-vis par une connexion directe dans la partie supérieure de la double enveloppe et est équipé d'une pale d'agitation adaptée pour agiter un mélange à haute consistance en solide (**Figure 3.15**). Le bioextrudat est introduit au débit fixé pour la bioextrusion et le suivi de la composition du mélange est assuré par prélèvements successifs dans le bioréacteur. Les essais ont été réalisés avec le lot de CMD 3 et le cocktail enzymatique mis en œuvre par la bioextrusion est le mélange Cellic Ctec 2 (90%) et NS22002 (10%) ou uniquement Cellic Ctec 2. Pour la fermentation, il a été employé une souche génétiquement modifiée de *Saccharomyces Cerevisiae*, Cellux 4 (Chapitre 4), fournie et préparée par l'INSAT.



**Figure 3.15** Couplage de l'extrudeur EV25 et du bioréacteur de 22L en vue d'ensemble (a) et vue de l'intérieur du réacteur lors du remplissage (b)

### **3.3.3.2 Suivi de la saccharification dans le bioréacteur**

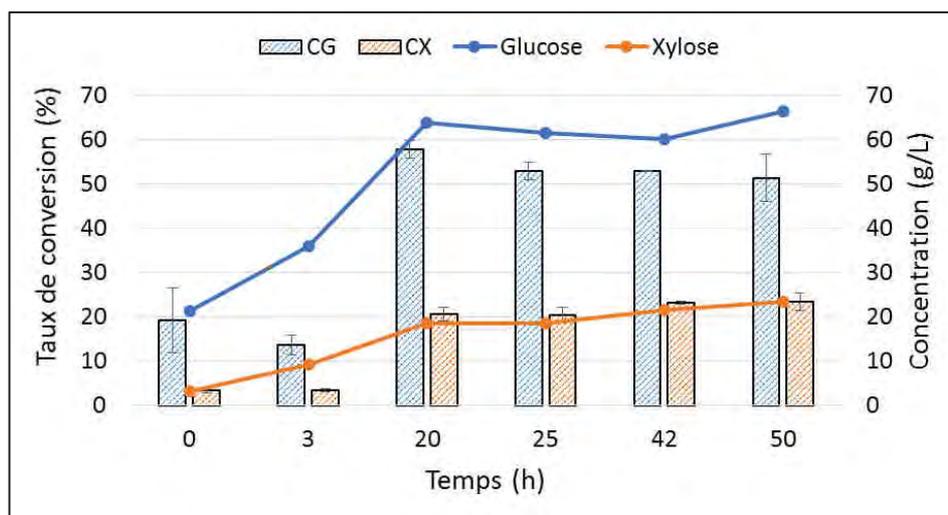
Le bioréacteur est alimenté en bioextrudat obtenu dans les conditions de bioextrusion rapportés dans le **Tableau 3.11** correspondant au ratio L/S enz élevé (3,7) et une charge enzymatique limitée de 11,5mg de protéines totales par g d'extrudat sec (6 FPU/g d'extrudat sec et 87 UI/g d'extrudat sec). Le remplissage du réacteur est mené sur 3h à un débit de 5,87 Kg de bioextrudat/h (3,77Kg de bioextrudat sec introduit, soit 17,61 Kg de mélange à une consistance de 21,4 % dans le bioréacteur de 22L). La température du bioréacteur est fixée à 40°C, et la saccharification en glucose et xylose est suivie pendant 6 jours sans ajout de levures dans le milieu.

Le suivi de la concentration en glucose et xylose dans le mélange du bioréacteur (**Figure 3.16**) montre que la saccharification de la cellulose se déroule bien rapidement jusqu'à un rendement en glucose libéré proche de 60% au bout de 20h, mais semble se stabiliser au-delà. Parallèlement celle des hémicelluloses plafonne à un rendement de 20% en xylose. Ces résultats sont proches de ceux obtenus avec un bioextrudat produit dans produit dans des conditions voisines (L/S=1,4 et 15g de protéines totales/Kg d'extrudat sec : essai 13 (**Tableau 3.7**) : 60% de rendement en glucose et 25% en xylose) pour une saccharification menée en réacteur Tornado™ à 20% de consistance du mélange.

**Tableau 3.11** Conditions de prétraitement et bioextrusion pour essai de saccharification dans le réacteur de 22L en employant le CMD 3

Prétraitement alcalin			Bioextrusion		
Lot de CMD		3	Qsol enz	Kg/h	2,86
Ss	rpm	300	Q bioext	Kg/h	5,87
Courant moteur	%	7,9	MS bioext	%	21,4
EMS	W.h/Kg	390	L/S enz	kg/kg	3,7
QS	kg/h	1,8	Teneur en eau	%	78,6
QNaOH	kg/h	166	TP 2	°C	52
[NaOH]	%	5,9	Charge cellulase	FPU/g d'extrudat	6
TP1	°C	123		FPU/g de cellulose	15
NaOH/CMD sec	%	6	Charge Xylanase	IU/ g d'extrudat sec	460
QH2SO4	kg/h	5,9		IU/ g d'hémicelluloses	1318
[H2SO4]	%	1,6	Activité xylanase provenant NS	IU/g ext sec	8
Qext	Kg/h	3,01	Charge prot totale	mg prot tot/g ext sec	11,5
MS ext	%	39,6			
Qfil	Kg/h	6			
MS fil	%	8,2			
L/Sb	kg/kg	1			
L/Sa	kg/kg	4,1			

Ss : Vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit entrée solide ; QNaOH et QH2SO4 : Débit des solutions de soude et d'acide sulfurique ; [NaOH] et [H2SO4] : Concentration des solutions de soude et acide sulfurique ; TP1 et TP2 : Sondes de température 1 et 2 ; Qext Q fil et Q bioext: Débit d'extrudat, du filtrat et du bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : Matière sèche de l'extrudat et du filtrat ; L/Sa, L/Sb et L/S enz : ratio Liquide/Solide des phases de prétraitement alcalin, neutralisation et imprégnation enzymatique ; FPU : Filter paper Units ; IU : International Units ; prot : protéine



**Figure 3.16** Taux de conversion du glucose (CG) et du xylose (CX) et leur concentrations au cours de la saccharification à une consistance de 21,4% et 40°C dans le bioréacteur de 22L

### 3.3.3.3 Saccharification et co-fermentation simultanées des bioextrudats dans le bioréacteur couplé à l'extrudeur

Comme observé dans le point précédent, la saccharification de la cellulose et des hémicelluloses dans le bioréacteur alimenté en continu par le bioextrudat se développe selon une cinétique conforme à celle menée pour les mêmes conditions opératoires dans le réacteur agité Tornado™ (Figure 3.17). L'avancement de la saccharification dans les premières heures de contact à 40°C dans le bioréacteur agité, qui conduit à une concentration dans le mélange atteignant plus de 60g/L en glucose et 20 g/L en xylose, permet d'envisager que leur fermentation par ajout de levures dans le bioréacteur.

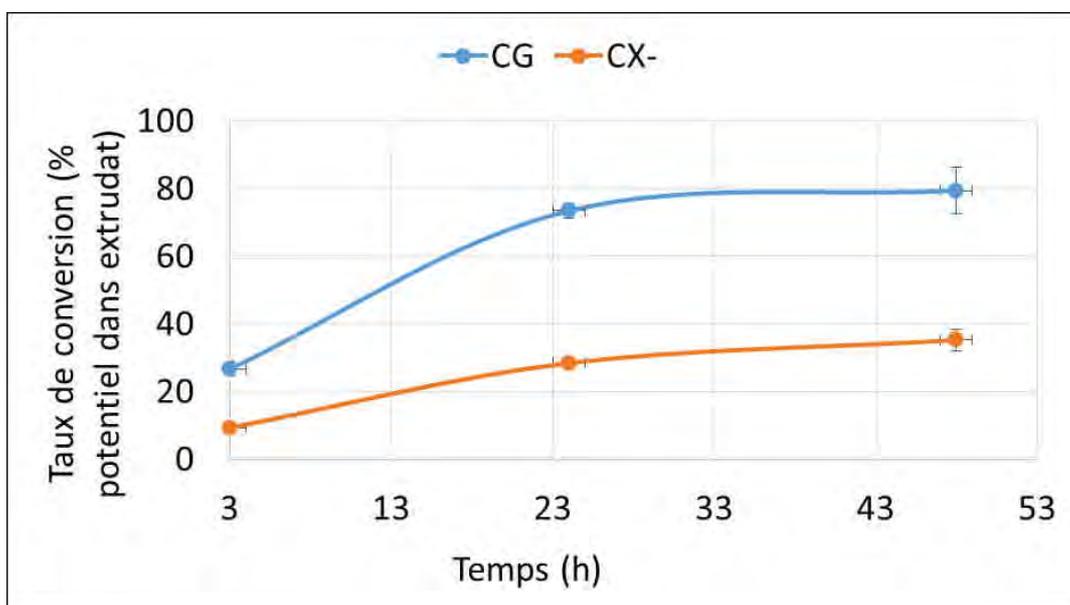


Figure 3.17 Taux de conversion en glucose (CG) et en xylose (CX) du bioextrudat obtenu lors de l'essai 3.3.3.3 à 20% de consistance, 45°C pendant 48h d'hydrolyse dans le réacteur Tornado™

Ainsi, le bioextrudat produit avec les conditions de bioextrusion préconisées dans auparavant (à L/S enz=2,3 et charge enzymatique= 23,3g protéines/Kg sec) a été chargé pendant 4h dans le bioréacteur à un débit de 4,34 Kg/h (Charge totale en bioextrudat 17,4Kg et 5,26kg sec) sous agitation (300 rpm) (Tableau 3.12). La température du bioréacteur a été maintenue à 45°C pendant les deux premières heures de charge (température optimale des enzymes hydrolytiques), puis abaissée progressivement pendant les deux heures suivantes pour se stabiliser à 30°C, température optimale pour les levures de fermentation. Le suivi de la puissance consommée par le moteur d'agitation du bioréacteur (Figure 3.18) montre que la viscosité du milieu, qui augmente avec la charge du réacteur, diminue ensuite avec l'avancement de la saccharification puis de la conversion en éthanol qui provoque sa liquéfaction (Figure 3.19). Les levures (Cellux 4, chapitre 4) sont introduites au bout de 4h, à la fin du remplissage

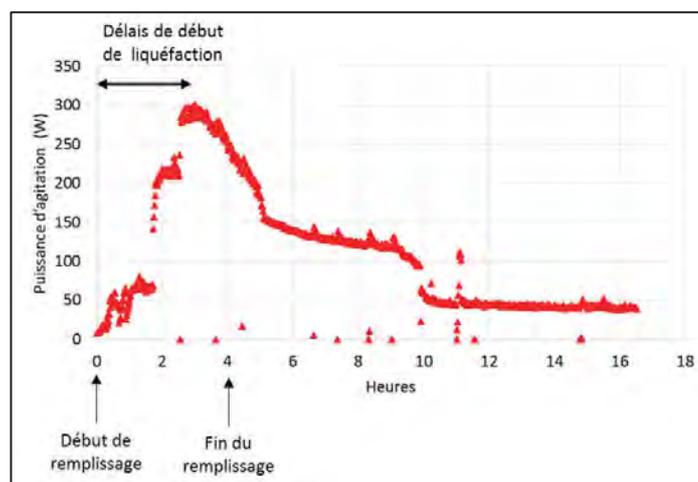
du bioréacteur, et le suivi de la concentration en glucose, xylose et éthanol dans le mélange (**Figure 3.20**) montre que la quasi-totalité du glucose libéré par la saccharification au cours des premières heures est rapidement consommée et transformé en éthanol qui atteint une concentration proche de 40g/L après 48h. Par contre, la concentration en xylose libéré par la saccharification (20g/L) reste quasiment constante, indiquant que sa conversion en éthanol est faible. Le bilan matière réalisé à partir de la quantité de bioextrudat et l'ajout de levures introduites dans le bioréacteur et de l'analyse des fractions des mélanges obtenu dans le bioréacteur au bout de 7 jours (

**Figure 3.21**) montre que le moût de fermentation représente plus de 14% de la matière sèche introduite : 82% des fibres insolubles ont été dissoutes, dont 90 et 92% de cellulose et hémicelluloses. La filtration (maille 1mm) et la centrifugation du filtrat permettent de séparer un résidu solide granuleux et un culot insoluble (**Figure 3.22**) qui contient au total 9,5% de la cellulose et 7,4% des hémicelluloses introduits dans le bioréacteur. Cependant, bien que quasi la totalité de la matière ait été solubilisée, ce qui prouve l'efficacité de l'hydrolyse de la matière, le rendement en éthanol obtenu est limité à 124 g/Kg de bioextrudat sec, soit 166g/kg de cellulose et xylose.

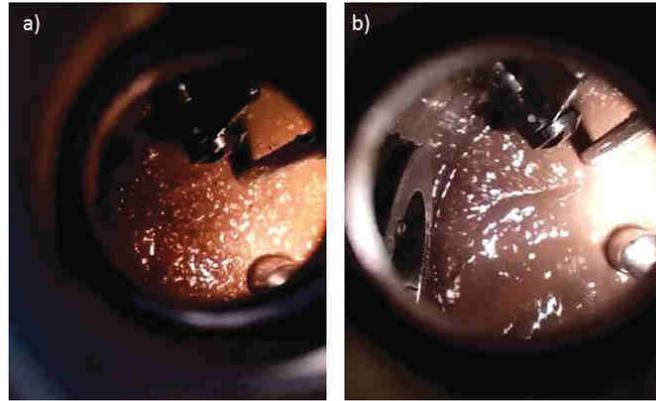
**Tableau 3.12** Conditions de prétraitement et bioextrusion pour essai 1 de saccharification et fermentation dans le réacteur de 22L

Extrusion			Bioextrusion		
Lot de CMD		3	Qsol enz	Kg/h	1,05
Ss	rpm	300	Q bioext	Kg/h	4,34
Courant moteur	%	7,5	MS bioext	%	29,4
EMS	W.h/Kg de CMD		L/S enz	kg/kg	
QS	kg/h	1,8			2,3
QNaOH	kg/h	1,68	TP 2	°C	50-52
[NaOH]	%	5,9	Charge cellulase	FPU/g d'extrudat	10,7
TP1	°C	110-123		FPU/g de cellulose	29
NaOH/CMD sec	%	6	Charge Xylanase	IU/ g d'extrudat sec	935
QH2SO4	kg/h	5,71		IU/ g d'hémicelluloses	2527
[H2SO4]	%	1,6	Activité xylanase provenant NS	IU/g ext sec	17
Qext	Kg/h	3,3,	Charge prot totale	mg prot tot/g ext sec	22,9
MS ext	%	38,2			
Qfil	Kg/h	5,74			
MS fil	%	9			
L/Sb	kg/kg	1			
L/Sa	kg/kg	4,1			

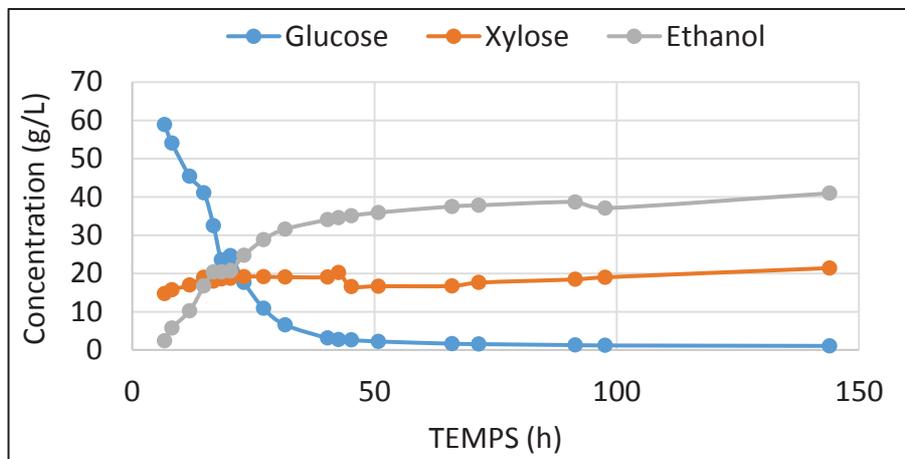
Ss : Vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit entrée solide ; QNaOH et QH2SO4 : Débit des solutions de soude et d'acide sulfurique ; [NaOH] et [H2SO4] : Concentration des solutions de soude et acide sulfurique ; TP1 et TP2 : Sondes de température 1 et 2 ; Qext Q fil et Q bioext: Débit d'extrudat, du filtrat et du bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : Matière sèche de l'extrudat et du filtrat ; L/Sa, L/Sb et L/S enz : ratio Liquide/Solide des phases de prétraitement alcalin, neutralisation et imprégnation enzymatique ; FPU : Filter paper Units ; IU : International Units ; prot : protéine



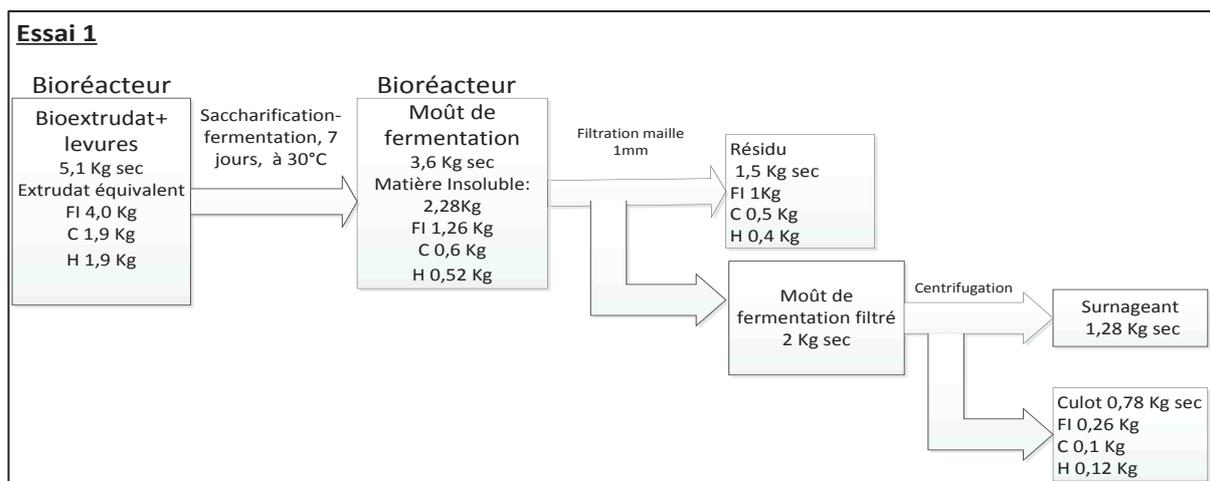
**Figure 3.18** Puissance d'agitation pour atteindre 300 tpm au cours des premières 16h d'utilisation du réacteur



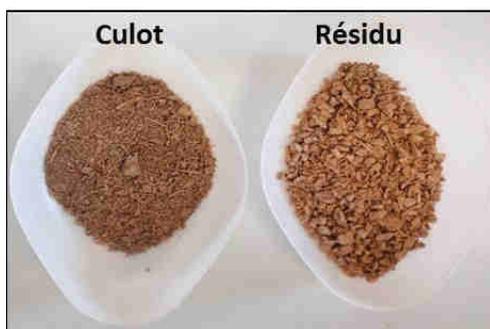
**Figure 3.19** Photos de l'intérieur du bioréacteur à la fin de la charge du bioréacteur (a) et 3h après la charge du bioréacteur (b), au bout de 3h de réaction le milieu est plus liquide, moins visqueux



**Figure 3.20** Concentration en glucose, xylose et éthanol obtenus au cours de l'essai 1 de saccharification-fermentation dans le réacteur de 22L à 30% de consistance (m/m) en employant la levure Cellux 4



**Figure 3.21** Bilan massique du moût de fermentation obtenu après 7 jours de saccharification et fermentation de l'essai 1



**Figure 3.22** Photo des fractions insolubles récupérées après SSCF du culot du moût de fermentation filtré et du résidu du moût de fermentation sans extractibles à l'eau et séchés

Ainsi, bien que la déconstruction des fibres insolubles du bioextrudat, obtenus avec un ratio L/S enz de 2,6 et une charge enzymatique de 23 g de protéine/Kg d'extrudat sec, se poursuit lors de la saccharification et fermentation dans le bioréacteur de 22L jusqu'à obtenir une solubilisation de 55% de la matière sèche du bioextrudat, le taux de saccharification limité de 60% en glucose et 20% en xylose se traduit par un rendement en éthanol correspondant à la quantité de sucres libérés avant l'introduction des levures (60% de conversion en glucose) 60g/L et 20% de xylose à 20g/L. L'augmentation du rendement de saccharification devrait alors permettre d'augmenter celui en éthanol.

Un nouvel essai a donc été réalisé avec un bioextrudat obtenu pour un ratio L/S enzymatique de 2,6 et une charge enzymatique élevée (32,4 mg de protéines totales/g d'extrudat sec)(Tableau 3.13), conditions dans lesquelles les rendements de saccharification sont élevés (essai 14 de la Figure 3.9) et la production en éthanol a été la plus élevée (Figure 3.13). La matière sèche étant importante (27,7%), du tampon citrate-phosphate est ajouté dans le bioréacteur lors de la phase de remplissage en bioextrudat (2h30 à un débit de 4,2 Kg/h soit 10,5Kg/h) de façon à maintenir une consistance initiale du mélange à une valeur proche de 20% lors de la phase de saccharification à 45°C (Figure 3.23). La dilution du milieu par apport de tampon citrate phosphate associé à une plus faible vitesse de rotation du modèle d'agitation se traduit par une puissance consommée par l'agitation dans le bioréacteur moins élevée (Figure 3.24) que dans le cas précédant (Figure 3.18), même si le taux de remplissage final en bioextrudat dans le bioréacteur a été plus faible (<50W de puissance d'agitation à 200 rpm à la fin du remplissage équivalent et 300rpm précédemment). Après introduction des levures, à la fin de la charge en bioextrudat, la viscosité du milieu chute rapidement, avec la conversion du glucose libéré en éthanol (Figure 3.25). Comme précédemment, celle du xylose apparaît faible. Du fait de la dilution du mélange par le tampon citrate phosphate, la concentration maximum en éthanol est plus faible (30g/L) que celle atteinte précédemment pour une saccharification fermentation menée à plus haute

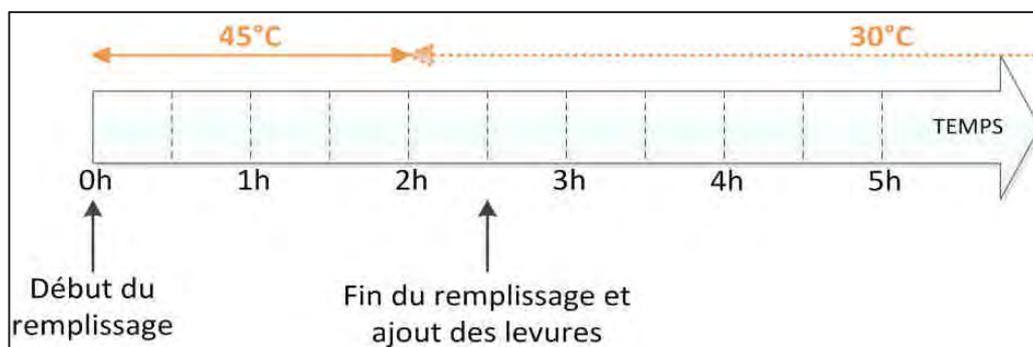
consistance. Cependant, la concentration en glucose atteinte dans le milieu à la fin de l'étape de saccharification (40g/L) correspond à 80% du glucose contenu dans le bioextrudat initialement, ce qui confirme l'efficacité de l'hydrolyse par les cellulases dans le bioréacteur. Par contre, la concentration en xylose atteinte (10g/L) ne correspond qu'à 15% du xylose initialement contenu dans le bioextrudat, confirmant la plus faible saccharification des hémicelluloses malgré une solubilisation élevée dans le bioréacteur. Bien qu'une contribution du xylose à la production d'éthanol ne puisse être totalement écartée, la faible disparition de ce sucre pendant la phase de fermentation en éthanol indique qu'elle sera faible et que l'essentiel de l'éthanol produit, dont la cinétique d'apparition correspond à la disparition du glucose, est attribuable à la conversion de ce dernier sucre. Et la concentration en éthanol atteinte (30g/L) qui correspond à un rendement de saccharification de la cellulose élevée (80%) permet de calculer la quantité d'éthanol produit et le rendement en éthanol par rapport au bioextrudat introduit : il est de 156g/Kg de bioextrudat sec, ce qui représente un gain de 35% par rapport à celui obtenu précédemment (**Tableau 3.14**).

Le bilan matière effectuée pour cet essai sur le moût de fermentation contenu dans le bioréacteur au bout de 6 jours de fonctionnement (**Figure 3.26**) montre 40% de la matière sèche du bioextrudat n'a pas été solubilisée, répartissant en 60% de résidu insoluble de granulométrie supérieur à 1mm et 40% de culot de centrifugation. L'analyse de la composition de ces résidus (**Tableau 3.15**) et du bilan et sucres contenu dans le moût de fermentation (**Figure 3.27**), montre que ce résidu non hydrolysé contient 20% du glucose qui est initialement introduit dans le bioréacteur, et correspond au glucose qui n'est pas hydrolysé par les enzymes. De plus, 30% du xylose initialement ajouté dans le bioréacteur est aussi retrouvé dans ce résidu. Cependant, la plus grande partie du xylose non consommé est retrouvé dans le filtrat du moût de fermentation, dont 10% du xylose initial est retrouvé sous forme libre et monomérique et 42% se trouve sous forme d'oligomères ou dans le solide non soluble. Les résultats obtenus montrent que 23% du xylose a été consommé par les levures, ce qui reste faible. De plus, une grande partie du xylose doit se retrouver sous forme non soluble ou d'oligomères (73% du xylose initial dans le bioréacteur). A la lumière de ces résultats, il est possible de dire qu'une faible partie des hémicelluloses sont hydrolysées (40%), mais aussi que sa consommation est réduite. Des études sur la SSCF ou SSF ont montré un effet négatif des oligomères de xylose sur les hémicellulases et sur la consommation du xylose par les levures (Jin et al., 2017; Qin et al., 2018, 2017). D'après les études de Jin et al. (2017), l'accumulation de xylooligomères peut provoquer une inhibition rétroactive des hémicellulases (plus affectées que les cellulases) et dans certains cas des résidus de lignines peuvent former des complexes avec ces résidus ce qui les rend particulièrement complexes à dégrader par des cocktails commerciaux et peuvent avoir des effets négatifs sur la croissance et le métabolisme des levures (Larsson et al., 2000).

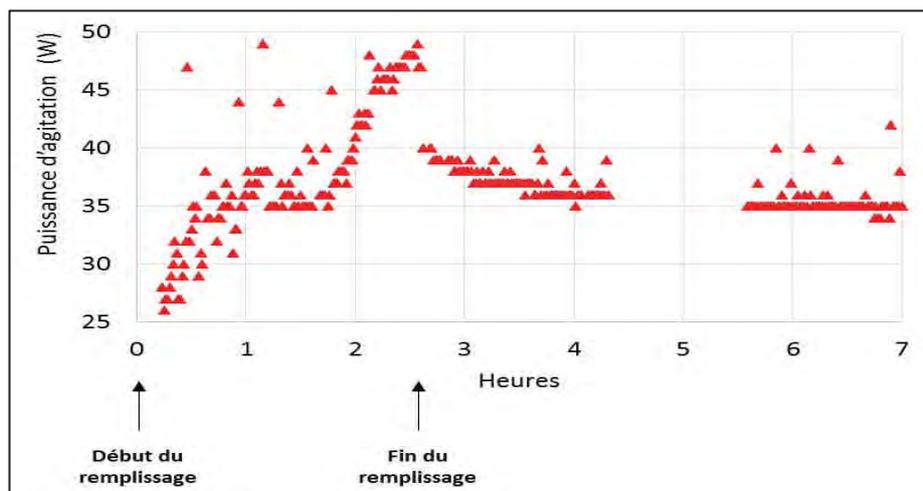
**Tableau 3.13** Conditions de prétraitement et bioextrusion pour essai 2 de saccharification et fermentation dans le réacteur de 22L

Extusion			Bioextrusion		
Lot de CMD		3	Qsol enz	Kg/h	0,99
Ss	rpm	300	Q bioext	Kg/h	4,2
Courant moteur	%	6,4	MS bioext	%	27,7
EMS	W.h/Kg de CMD sec		L/S enz	kg/kg	2,5
QS	kg/h	1,6			
QNaOH	kg/h	1,58	TP 2	°C	45
[NaOH]	%	5,87	Charge cellulase	FPU/g d'extrudat	15,7
TP1	°C	136		FPU/g de cellulose	42,1
NaOH/CMD sec	%	6,5	Charge Xylanase	IU/ g d'extrudat sec	1298
QH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kg/h	5,87		IU/ g d'hémicelluloses	3492
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	%	1,6	Activité xylanase provenant NS	IU/g ext sec	0
Qext	Kg/h	3,2	Charge prot totale	mg prot tot/g ext sec	32,4
MS ext	%	33,7			
Qfil	Kg/h	5,82			
MS fil	%	8,7			
L/Sb	kg/kg	1,1			
L/Sa	kg/kg	4,6			

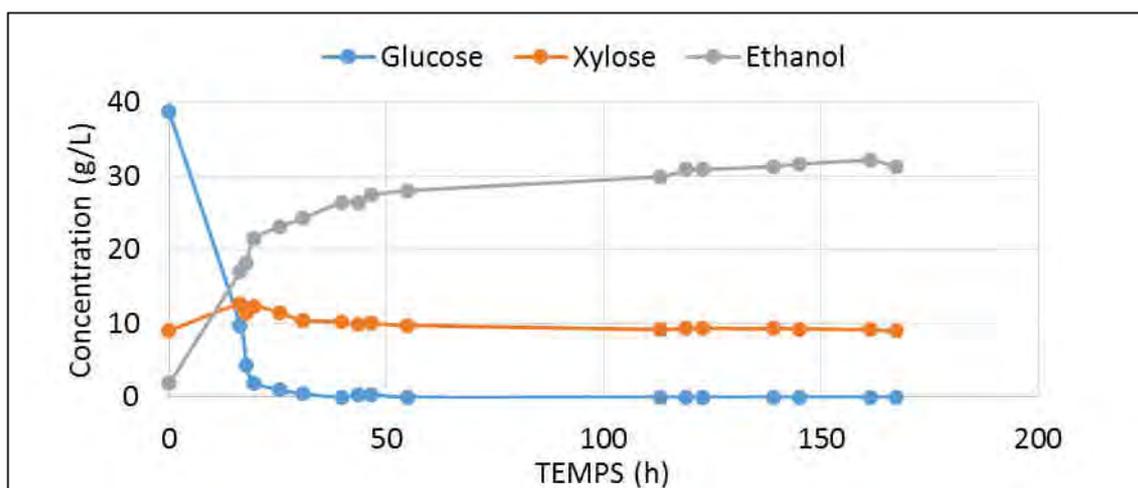
Ss : Vitesse de vis ; EMS : Energie Mécanique Spécifique ; QS : Débit entrée solide ; QNaOH et QH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Débit des solutions de soude et d'acide sulfurique ; [NaOH] et [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] : Concentration des solutions de soude et acide sulfurique ; TP1 et TP2 : Sondes de température 1 et 2 ; Qext Q fil et Q bioext: Débit d'extrudat, du filtrat et du bioextrudat ; MS ext, MS fil et MS bioext : Matière sèche de l'extrudat et du filtrat ; L/Sa, L/Sb et L/S enz : ratio Liquide/Solide des phases de prétraitement alcalin, neutralisation et imprégnation enzymatique ; FPU : Filter paper Units ; IU : International Units ; prot : protéine



**Figure 3.23** Organisation de l'essai pendant les premières heures



**Figure 3.24** Puissance d'agitation mesurée du réacteur pendant les premières heures de l'essai 2 de saccharification et fermentation dans le bioréacteur



**Figure 3.25** Concentration en glucose, xylose et éthanol obtenus au cours de l'essai 2 de saccharification-fermentation dans le bioréacteur de 22L à 20% de consistance (m/m) en utilisant la levure Cellux 4

**Tableau 3.14** Conditions de bioextrusion et de saccharification-fermentation de l'essai 1 et 2 avec les résultats finaux obtenus

Expérience		1	2		
CMD		3	3		
Conditions bioextrusion	L/S enz	kg.kh-1/Kg.Kg-1	2,3	2,6	
	Charge cellulase	FPU/g d'extrudat sec	11	15,7	
		FPU/g de cellulose	29	42,1	
	Charge Xylanase	UI/ g d'extrudat sec	935	1298	
		UI/g d'hémicelluloses	2527	3492	
	NS22002		oui	non	
Conditions du réacteur	Temps de charge	h	4	2,5	
	Consistance	% (m/m)	29,4	19	
	Température	°C	45-50°C durant 2h puis 30°C	45°C durant 2h puis 30°C	
	Remplissage	Kg	18,7	15,5	
	Bioextrudat sec	Kg	5,1	2,9	
	Vitesse d'agitation	Tpm	300 tpm durant 10h, puis 200 tpm	200 tpm (augmentation à 300 tpm de 4,3h et 5,6h)	
	Résultats	[Ethanol]finale	g/L	41,0	31,2
		[Glucose]finale	g/L	1,1	0,0
		[Xylose]Finale	g/L	21,4	8,9
Matière insoluble		% matière sèche initiale	44,3	40,7	
Temps de stabilisation de la puissance d'agitation		h	10,0	0,5	
Solides Insolubles finales*		% masse du prélèvement	11,4	5,0	
[Ethanol]*		g/Kg	36,3	29,7	
Ethanol produit*		g	653,5	460,3	
Ethanol/bioextrudat sec*		g/Kg	124,0	156,2	
Ethanol/ CMD sec	g/Kg	150,9	215,5		

\*Mesurée par INSAT

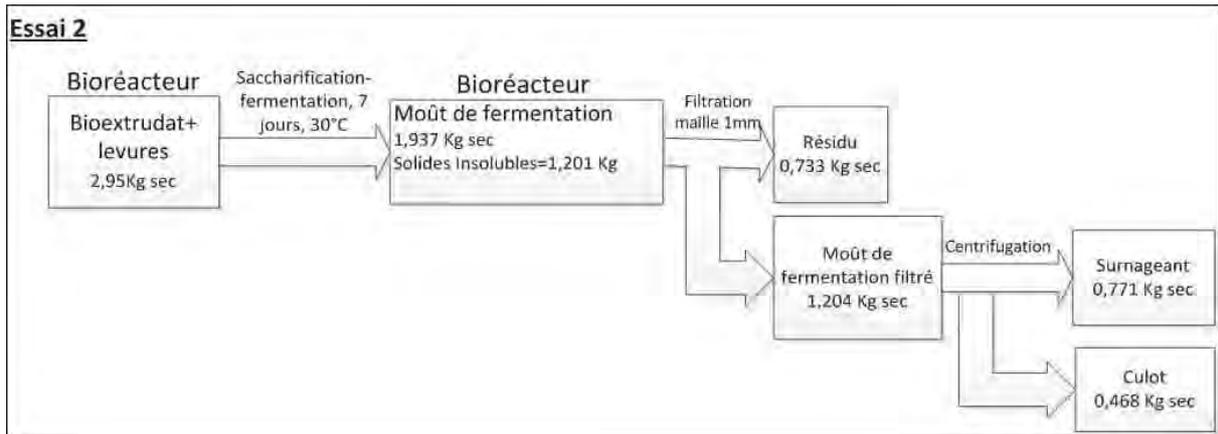


Figure 3.26 Bilan massique des matières insolubles dans le moût de fermentation

Tableau 3.15 Composition du grain dur et des résidus contenus dans les moûts de fermentation des essais A et C, déterminés par ADF-NDF-KMNO<sub>3</sub>

		Grain dur*	Résidu essai C
Fraction Insoluble	%MS	86,3	66,5
Cellulose	%FI	46	45
Hémicelluloses	%FI	47,3	45
Lignines	%FI	5,9	9,2

\*Grain dur analysé dans chapitre 2, 2.2.4 Granulométrie du lot de CMD 3; MS : Matière Sèche; FI : Fibre Insoluble

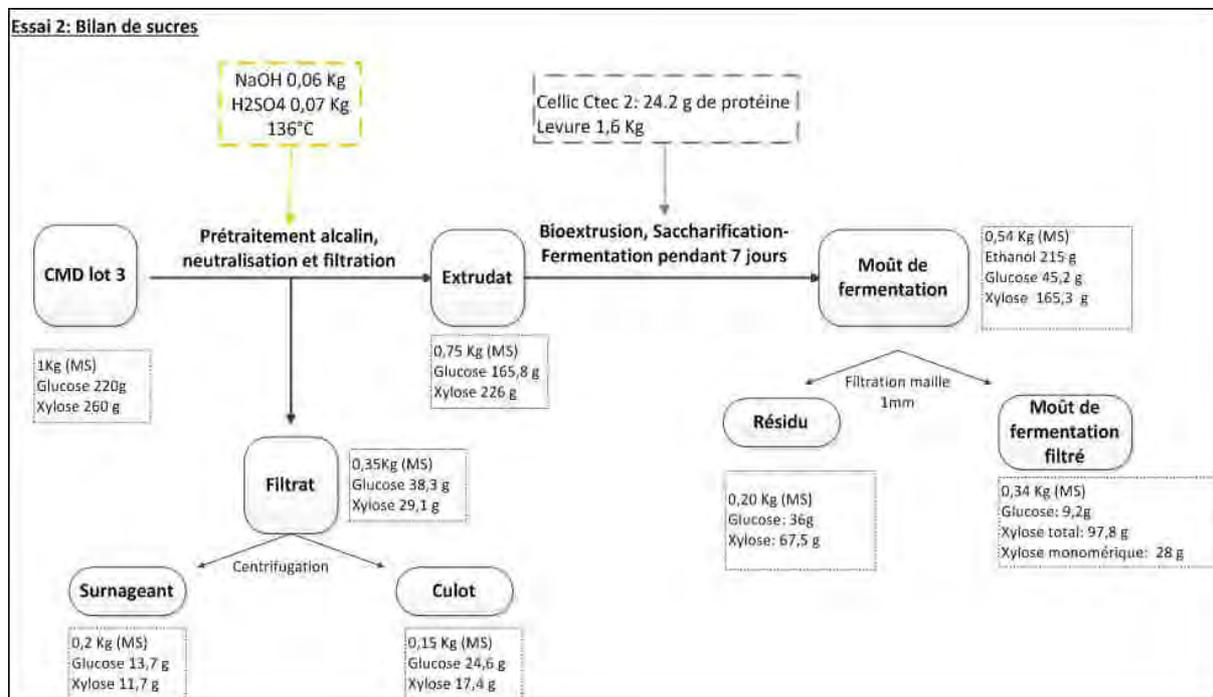
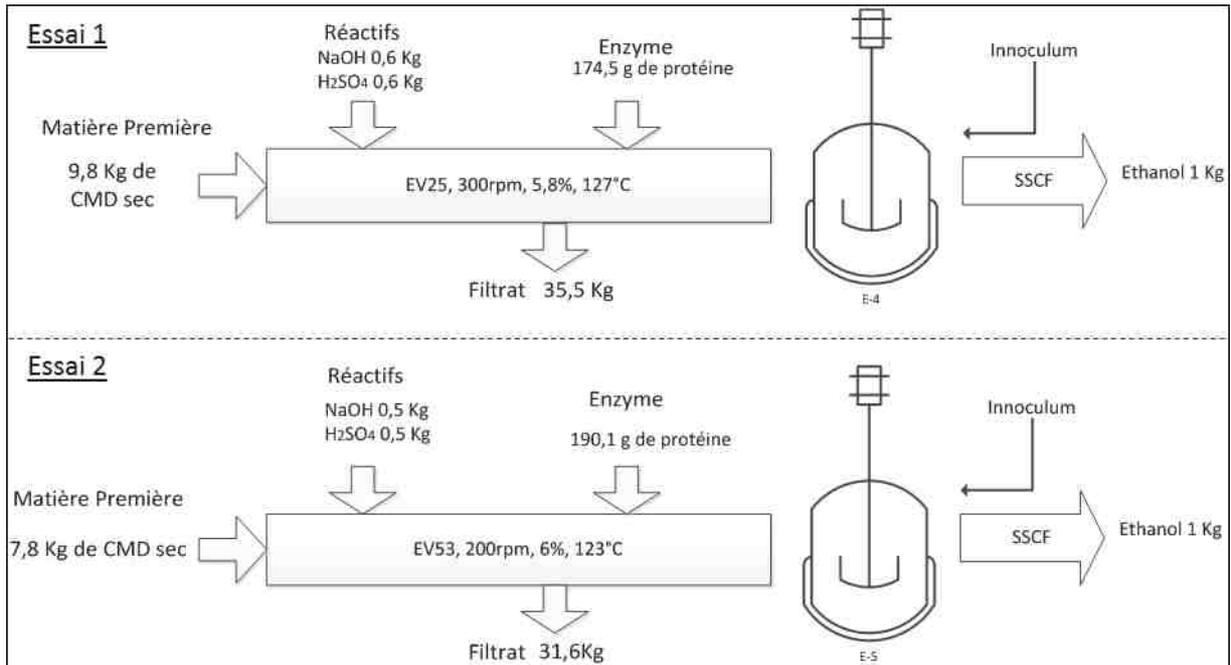


Figure 3.27 Bilan de glucose et xylose de l'essai 2 de saccharification-fermentation

Les résultats obtenus lors de cet essai ont mis en évidence qu'une diminution de la consistance favorise l'hydrolyse et la consommation du glucose. Notamment, un remplissage du bioréacteur à 45°C a eu un effet positif sur l'hydrolyse de la cellulose et la liquéfaction de la matière. Cependant, il serait possible que la solubilisation d'hémicelluloses lors de l'étape de bioextrusion, soit responsable de la production d'oligomères de xylose non hydrolysables et qui nuisent la fermentation du xylose. Ainsi, des vérifications de la présence de xylooligomères et de complexes lignine-carbohydrates seraient intéressantes afin de déterminer leur présence dans le moût de fermentation et leur effet sur la fermentation du xylose (Qin et al., 2018).

#### **3.3.3.4 Conclusion sur les essais de saccharification/fermentation**

Lors de cette étude, deux essais de saccharification et fermentation séquencée (SFS) ont été réalisées en faisant varier les conditions de bioextrusion, de remplissage du bioréacteur et de différentes consistances initiales (27% et 20%). En termes de bioextrusion, les deux essais sont menés avec des ratios L/S enz proches (2,6 et 2,5) et une charge enzymatique plus élevée est appliquée lors du second essai. De plus, le second essai a été réalisé sans supplémentation en hémicellulases. D'autre part, des différences de remplissage du bioréacteur sont à noter, dans le cas du second essai, le bioréacteur est moins rempli que pour le premier essai. Finalement, pour la SFS du second essai la consistance dans le réacteur est 10% plus faible par rapport à l'essai 1. L'ensemble de ces conditions ont favorisé une liquéfaction et une saccharification plus rapide et plus élevée de la cellulose et des hémicelluloses, et donc un rendement en éthanol plus élevé. En employant, les conditions du second essai, la production d'un kilo d'éthanol requière moins de biomasse et moins de réactifs chimiques, mais une charge enzymatique plus élevée est employée (**Figure 3.28**). Toutefois, pour les estimations économiques du procédé, le prix de la biomasse et des réactifs est fixe, tandis que le prix des enzymes varie en fonction de la quantité d'éthanol. En effet, le prix des enzymes, et donc leur coût est fixé en euros/ L d'éthanol, donc lorsque la production en éthanol est plus élevé, le coût des enzymes diminue. En vue de ces informations, donner une priorité à un meilleur rendement en éthanol est plus bénéfique économiquement pour diminuer les coûts opératoires que diminuer le coût lié à l'enzyme potentiellement ayant un effet négatif sur le rendement.



**Figure 3.28** Bilan des matières nécessaires pour produire un kilo d'éthanol selon les conditions de l'essai 1 et 2 de saccharification-fermentation

Néanmoins, une amélioration du rendement est envisageable en augmentant le rendement en éthanol notamment par une hausse de la production et conversion du xylose. Quelques suggestions possibles sont énumérées :

- Supplémentation par des laccases ou des enzymes ayant des activités spécifiques à la dégradation des xylooligomères et complexes lignines-carbohydrates
- Supplémentation en levures au cours de la SSCF pour stimuler la consommation de xylose (Raj and Krishnan, 2019)
- Fermentation par une levure tolérante aux inhibiteurs de type xyloolignomères et lignines

### 3.4 Conclusion du chapitre

Les résultats de ce chapitre ont mis évidence une solubilisation des hémicelluloses contenues dans la fibre prétraitée au cours de la bioextrusion, notamment en employant un ratio L/S enz adapté (2,3-3 permettant d'obtenir une teneur en eau autour de 72-75%). De ce fait, la destruction de la barrière formée par les hémicelluloses favorise la production de glucose et xylose pendant la saccharification du bioextrudat en réacteur après sortie de l'extrudeur. Quant à la charge enzymatique, elle possède

une influence sur la cinétique et l'optimum de conversion optimal lors de l'hydrolyse de la matière après bioextrusion, une augmentation de la charge enzymatique est favorable à la conversion des sucres, cependant son effet est limité. En effet, les charges en cellulase maximale ne correspondent pas toujours au maximum de production en glucose (cas du CMD 2). Une supplémentation en NS22002, permettant ainsi d'augmenter la charge en hémicellulases a permis d'atteindre des meilleurs taux de conversion en glucose et xylose, mais une charge trop importante n'a pas permis d'atteindre des taux de conversion bien plus importants qu'en employant une dose plus faible. Les essais de fermentation réalisés par l'INSAT, partenaire du projet, soutiennent ces résultats lors des essais de SSCF menés dans des réacteurs de 5L. La bioextrusion permet un fractionnement de la matière accéléré de part un mélange distributif et intense des enzymes à l'intérieur de la matière prétraitée et d'une destructuration mécanique induite par l'extrudeur, provoquant une amélioration des sucres libérés lors de la saccharification en réacteur fermé.

Lors des essais de couplage entre prétraitement et saccharification-fermentation dans le réacteur de 22L, une liquéfaction efficace du milieu est obtenue dans un temps de réaction court (inférieur à 3h), ce qui constitue un avantage majeur de la bioextrusion. Notamment, un des points critiques de l'hydrolyse à haute consistance est la viscosité pendant les premières heures de la réaction qui conditionne l'efficacité de la saccharification pour la suite (Jin et al., 2017). De cette manière, le fractionnement accéléré obtenu par l'introduction des enzymes dans l'extrudeur permet de surmonter une des limites majeures de l'hydrolyse à haute consistance. Ainsi, le procédé permet de diminuer le temps de saccharification-fermentation, notamment une grande partie du glucose (% 80) est libéré en fin de charge du bioréacteur (3h) et la fermentation est quasiment stabilisée au bout de 48h.

Par rapport au projet antérieur, ces résultats apportent des précieuses informations sur les interactions de ces différentes étapes lors que le procédé est mené en continu, dans un bioréacteur à échelle pilote. A partir des données recueillies sur l'essai 1 de saccharification-fermentation, une analyse plus réaliste sur les profits et les coûts d'un tel procédé à échelle industrielle ont été obtenus (**Tableau 3.16**). Les conditions employées lors de cet essai ne sont pas optimisées, de ce fait un faible revenu est obtenu, cependant les coûts de production ont été réduits de 4 millions d'euros. De cette manière, des coûts plus cohérents par rapport à lors qu'il a été employé 2 extrudeur pour le prétraitement de la matière ont été obtenus. La modification des conditions de bioextrusion et de saccharification-fermentation permettraient ainsi d'obtenir des revenus plus importants en éthanol. De plus, une augmentation de la production et la consommation de xylose respectivement, par les enzymes et les levures serait favorable à augmenter ce revenu. En réalisant, des essais plus proches des conditions favorables à la production d'éthanol, des études économiques et environnementales pourraient être réalisées afin d'atteindre un procédé durable.

**Tableau 3.16** Evaluation techno-économique de la production de bioéthanol à parti de coproduit de maïs doux réalisée par MAGUIN

<b>Paramètres</b>	<b>BABET-REALS</b>	<b>BABETHANOL</b>
Production éthanol m <sup>3</sup> /y	6,544	5,472
l/t biomasse sèche	218	182
Production de CH <sub>4</sub> MWhHHV/y*	57,402	83,611
Electricité consommée MWh/y	10,726	12,904
Vapeur consommée t/y	21,012	50,991
Alcalin consommé t/y	1,851	4,2
Acid consommé t/y	1,665	3
<b>Profits et charges</b>	<b>BABET-REALS</b>	<b>BABETHANOL</b>
Revenu d'éthanol €/y	3,272,096	3,392,708
Revenu en méthane €/y*	4,993,974	6,384,874
<b>Revenu total €/y</b>	<b>8,266,070</b>	<b>9,777,582</b>
Coûts opératoires €/y	7,715,524	12,681,317
Coût de main d'œuvre €/y	1,030,000	805, 000
<b>Coûts opérationnelles totaux €/y</b>	<b>8,745,524</b>	<b>13,486,317</b>
*Méthanisation des effluents (filtrat et partie non soluble du moût de fermentation) réalisée par SOLAGRO partenaire du projet BABET-REAL 5		

### 3.5 Références

- Baks, T., Kappen, F.H.J., Janssen, A.E.M., Boom, R.M., 2008. Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B. licheniformis*. *Journal of Cereal Science* 47, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.03.011>
- Boonchuay, P., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P., Hanmoungjai, P., Watanabe, M., Takenaka, S., Chaichaso, T., 2018. An integrated process for xylooligosaccharide and bioethanol production from corncob. *Bioresource Technology* 256, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.004>
- Brault, J., 2013. Développement d'un procédé innovant de dégradation enzymatique des parois végétales pour la production de bioéthanol seconde génération (thesis). Toulouse, INPT.
- Cha, Y.-L., Yang, J., Park, Y., An, G.H., Ahn, J.-W., Moon, Y.-H., Yoon, Y.-M., Yu, G.-D., Choi, I.-H., 2015. Continuous alkaline pretreatment of *Miscanthus sacchariflorus* using a bench-scale single screw reactor. *Bioresource Technology* 181, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.079>
- Chundawat, S.P.S., Uppugundla, N., Gao, D., Curran, P.G., Balan, V., Dale, B.E., 2017. Shotgun Approach to Increasing Enzymatic Saccharification Yields of Ammonia Fiber Expansion Pretreated Cellulosic Biomass. *Front. Energy Res.* 5. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00009>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., Ballesteros, M., 2014. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresource Technology* 158, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.041>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renewable Energy* 114, 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>
- Gao, D., Uppugundla, N., Chundawat, S.P., Yu, X., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V., Dale, B.E., 2011. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for Biofuels* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-5>
- Gatt, E., 2019. Etude de la déconstruction de résidus agricoles lignocellulosiques par extrusion biocatalytique (Thèse INP)
- Gatt, E., Rigal, L., Vandenbossche, V., 2018. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review. *Industrial Crops and Products* 122, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.069>
- Govindasamy, S., Campanella, O.H., Oates, C.G., 1997. Enzymatic hydrolysis of sago starch in a twin-screw extruder. *Journal of Food Engineering* 32, 403–426. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00017-4)
- Han, M., Kim, Y., Cho, W.-S., Choi, G.-W., Chung, B.-W., 2016. An integrated process for continuous cellulosic bioethanol production. *Korean J. Chem. Eng.* 33, 223–229. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0121-z>
- Humbird, D., Mohagheghi, A., Dowe, N., Schell, D.J., 2010. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover. *Biotechnology Progress* 26, 1245–1251. <https://doi.org/10.1002/btpr.441>
- Jin, M., Sarks, C., Bals, B.D., Posawatz, N., Gunawan, C., Dale, B.E., Balan, V., 2017. Toward high solids loading process for lignocellulosic biofuel production at a low cost. *Biotechnology and Bioengineering* 114, 980–989. <https://doi.org/10.1002/bit.26229>
- Jørgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 862–870. <https://doi.org/10.1002/bit.21115>
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B.A., Blanch, H.W., 2012. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering* 109, 1083–1087. <https://doi.org/10.1002/bit.24370>
- Larsen, J., Østergaard Petersen, M., Thirup, L., Wen Li, H., Krogh Iversen, F., 2008. The IBUS Process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. *Chem. Eng. Technol.* 31, 765–772. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800048>
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.-O., Jönsson, L.J., 2000. Influence of Lignocellulose-Derived Aromatic Compounds on Oxygen-Limited Growth and Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, in: Finkelstein, M., Davison, B.H. (Eds.), *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 2–6, 1999, in Fort Collins, Colorado, Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 617–632. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1392-5\\_47](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1392-5_47)

- Nahar, N., Ripplinger, D., Pryor, S.W., 2017. Process yield and economic trade-offs for enzymatic hydrolysis of alkaline pretreated corn stover. *Biomass and Bioenergy* 99, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.001>
- Paës, G., Burr, S., Saab, M.-B., Molinari, M., Aguié-Béghin, V., Chabbert, B., 2013. Modeling Progression of Fluorescent Probes in Bioinspired Lignocellulosic Assemblies. *Biomacromolecules* 14, 2196–2205. <https://doi.org/10.1021/bm400338b>
- Qin, L., Li, X., Liu, L., Zhu, J.-Q., Guan, Q.-M., Zhang, M.-T., Li, W.-C., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., 2017. Dual effect of soluble materials in pretreated lignocellulose on simultaneous saccharification and co-fermentation process for the bioethanol production. *Bioresource Technology* 224, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.106>
- Qin, L., Zhao, X., Li, W.-C., Zhu, J.-Q., Liu, L., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., 2018. Process analysis and optimization of simultaneous saccharification and co-fermentation of ethylenediamine-pretreated corn stover for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels* 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1118-8>
- Raj, K., Krishnan, C., 2019. Improved high solid loading enzymatic hydrolysis of low-temperature aqueous ammonia soaked sugarcane bagasse using laccase-mediator system and high concentration ethanol production. *Industrial Crops and Products* 131, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.032>
- Ramos, L.P., da Silva, L., Ballem, A.C., Pitarelo, A.P., Chiarello, L.M., Silveira, M.H.L., 2015. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresource Technology* 175, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.087>
- Tolan, J.S., 2002. Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Techn Environ Policy* 3, 339–345. <https://doi.org/10.1007/s10098-001-0131-x>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez-Melendez, O., Evon, P., Barzana, E., Vilarem, G., Rigal, L., 2016. Suitability assessment of a continuous process combining thermo-mechano-chemical and bio-catalytic action in a single pilot-scale twin-screw extruder for six different biomass sources. *Bioresource Technology* 211, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.072>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Industrial Crops and Products* 67, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Yang, J., Kim, J.E., Kim, H.E., Yu, J.-H., Cha, Y.-L., Kim, K.H., 2017. Enhanced enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated empty fruit bunches at high solids loadings by the synergism of hemicellulase and polyethylene glycol. *Process Biochemistry* 58, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.019>



# Chapitre IV : Matériel et Méthodes

## Table des matières

<b>4. Matériels et méthodes</b> .....	<b>241</b>
4.1 Matériel .....	241
4.1.1 Co-produit de maïs doux .....	241
4.1.2 Extrudeurs .....	241
4.1.3 Cocktails enzymatiques .....	242
4.1.4 Levure .....	243
4.1.5 Appareillage pour hydrolyses enzymatique .....	243
4.1.6 Bioréacteur échelle pilote .....	245
4.2 Méthodes .....	246
4.2.1 Fractionnement et bioextrusion en extrudeur bi-vis .....	246
4.2.2 Hydrolyses enzymatiques .....	246
4.2.3 SSCF réalisée dans le réacteur de 22L Solaris .....	249
4.2.4 Analyse chromatographiques .....	250
4.2.5 Analyse des extrudats et filtrats .....	250
4.2.6 Analyse des protéines contenus dans les cocktails enzymatiques .....	253
4.2.7 Méthodes de calcul .....	254

## 4. Matériels et méthodes

### 4.1 Matériel

#### 4.1.1 Co-produit de maïs doux

Les 3 lots de coproduit du maïs doux (*Zea mays L. saccharata*) (CMD) ont été prélevés en sortie de conserverie et ont été fournis après séchage par SARL Soupro+ (Castelmoron sur Lot, France).

#### 4.1.2 Extrudeurs

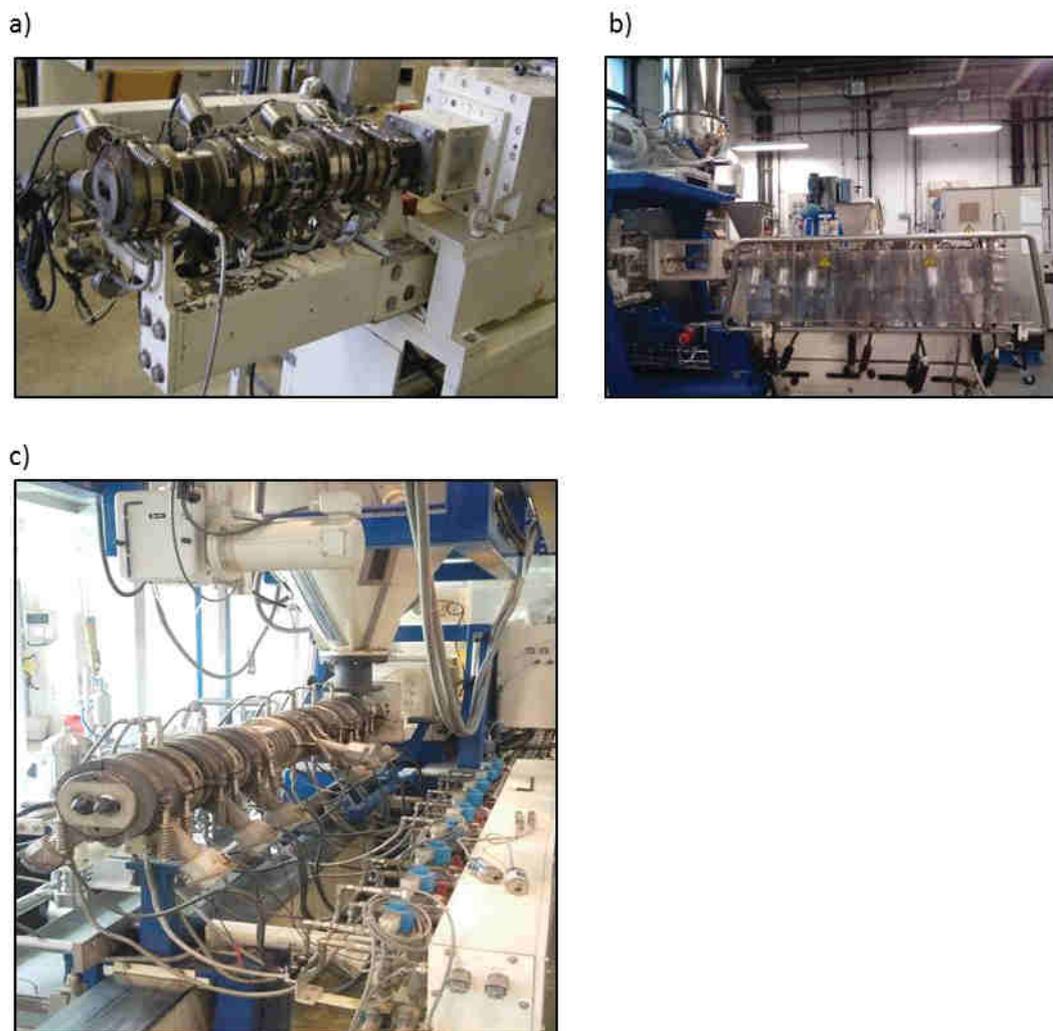
Les caractéristiques des extrudeurs employés dans cette thèse sont regroupées dans le **Tableau 4.1**. Les études préliminaires de prétraitement alcalin ont été réalisées sur un extrudeur de type Clextral BC21 (**Figure 4.1a**). L'introduction solide a été réalisée par une trémie de type Ktron KCL-KT20 (Coperion, GmbH, Germany). Les pompes employées pour l'introduction de la soude et l'acide phosphorique sont respectivement, les pompes DKM 547640 20030 MTRV (Clextral, France) et DKM SUPER K 9916 (CLEXTRAL, France).

**Tableau 4.1** Caractéristiques des extrudeurs

		Unités	BC21	EV25	EV53
Extrudeur	Débits d'entrée solide	kg/h	1-10	1-10	20-200
	Nombre de modules		7	10	9
	Longueur utile de fourreau	mm	700	1000	1908
	Diamètre externe de la vis	mm	21	25	53
Moteur vis	Type		AC		ABB DMI225
	Puissance	KW	8,5	27	152
	Vitesse	tr/min	2000	2000	1600
Groupe d'entraînement de vis	Vitesse maximum de vis	tr/min	682	1200	800
	Volume d'huile (ISO VG 320)	L	10	-	50

Les expériences d'optimisation du prétraitement alcalin avec NaOH et KOH ainsi que les expériences de bioextrusion ont été réalisées sur un extrudeur bi-vis Clextral EV25 A115 (Clextral, France)(**Figure 4.1b**). Il est assisté par ordinateur, il est ainsi possible de suivre, les températures mesurées, la vitesse de vis et le couple vis. Les vis utilisées pour le prétraitement sont en métallurgie spéciale anticorrosive. L'introduction solide a été réalisée par une trémie de type Ktron KCL-KT20 (Coperion, GmbH, Germany). Les pompes employées pour l'introduction de la soude et de l'acide sulfurique sont, respectivement les pompes DKM SUPER JPP6.35 (CLEXTRAL, France) et DKM SUPER K 9916 (CLEXTRAL, France). La solution enzymatique a été introduite soit par la pompe Clextral DKM SUPER J PP 3.175 lorsque le débit était inférieur à 1Kg/h, soit par la pompe Milroyal PMRD13493 SM 70 lorsque le débit

dépassait 1Kg/h. Les expériences à l'échelle semi-industrielle ont été réalisées sur un extrudeur de type EVOLUM HT53 (CLEXTRAL, France)(**Figure 4.1 c**). C'est un extrudeur également assisté par ordinateur, il est ainsi possible de suivre au fur et à mesure du temps, les températures mesurées, la vitesse de vis et le couple vis. L'alimentation en coproduit de maïs doux est réalisée par un doseur pondéral à bande de type Ktron SWB-300-N (Coperion, GmbH, Germany) dont la capacité atteint 200 Kg/h et introduite par un densifieur de type 100 KSW (Kreyenborg). Les solutions de soude et d'acide sulfurique ont respectivement été introduites par des pompes volumétriques à piston, DKM KLCAMP150/32 (CLEXTRAL, France) et DKM SUPER MD PP63 (CLEXTRAL, France).



**Figure 4.1** Photos des extrudeurs employés pour cette thèse : BC21 (a) et EV25 (b) dans les installations à Toulouse et EV53 (c) dans les installations à Tarbes

#### 4.1.3 Cocktails enzymatiques

Les cocktails enzymatiques employés tout au long de ce manuscrit ont été fournis par Novozymes (Franklinton, USA). Il s'agit du cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 et NS22002. Tous les cocktails ont été

livrés sous forme liquide, dans une solution visqueuse contenant du sorbitol. Les caractéristiques des deux cocktails sont regroupées dans le **Tableau 4.2**.

**Tableau 4.2** Caractéristiques des cocktails employés

Référence Novozyme		Cellic® Ctec2	NS22002
Données novozyme (1)			
Microorganisme		<i>trichoderma reesei</i>	<i>Humicola insolens</i>
Température optimale	°C	45-50	40-60
pH optimale		5,0-5,5	5,0-6,5
Activités mesurées (2)			
	Unités		
Activité cellulase papier filtre	FPU/mL	123,3	-
Activité xylanase	UI/mL	10208	1711
Activité $\beta$ -xylosidase	UI/mL	21,9	3,3
Activité $\alpha$ -arabinofuranosidase	UI/mL	1,9	0,74
Activité féruloylestérase	UI/mL	0,22	9,2
Activité acétyl estérase	UI/mL	0,12	0,78
Dosage protéique (3)			
[protéines]	mg/mL	254,9 (6,8)	36,9(3,0)
Caractéristiques			
Matière sèche	% (m/m)	48,88	29,21
Matière minérale	% MS	19,04	0,28
Densité		1,22	1,16
Dosage sucres libres			
[glucose]	g/L	253	10,8
[xylose]	g/L	4,8	-

(1) [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com) (2) Dosage réalisé par URCA (3) Dosage par Kit Lowry

#### 4.1.4 Levure

Les fermentations dans le bioréacteur de 22L ont été réalisées en employant la levure Cellux™ 4 de Leaf (Lesaffre Advanced fermentations). La levure Cellux™ est une souche génétiquement modifiée de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant une xylose isomérase de *Clostridium*. Elle possède une tolérance élevée pour l'éthanol.

#### 4.1.5 Appareillage pour hydrolyses enzymatique

##### 4.1.5.1 Bain marie

Le bain marie employé pour réaliser les expériences d'hydrolyse enzymatique dans des conditions diluées de chapitre 1 est le Fisherbrand™ Shaking POLYTEST 30. Celui-ci possède une agitation longitudinale avec une cuve en acier inoxydable possédant un chauffage et une sonde température.



**Figure 4.2** Bain marie utilisé pour les expériences d'hydrolysabilité

#### 4.1.5.2 Incubateur thermostaté et agitateur pour tubes de 2mL

L'incubateur qui a été employé est le Vortemp™ 56 de Labnet possédant une agitation circulaire de 3mm. Il possède 56 emplacements pour des tubes de 1 à 2mL.



**Figure 4.3** Incubateur utilisé pour expériences d'hydrolyse à haute consistance

#### 4.1.5.3 Système Tornado™ 6 Plus System

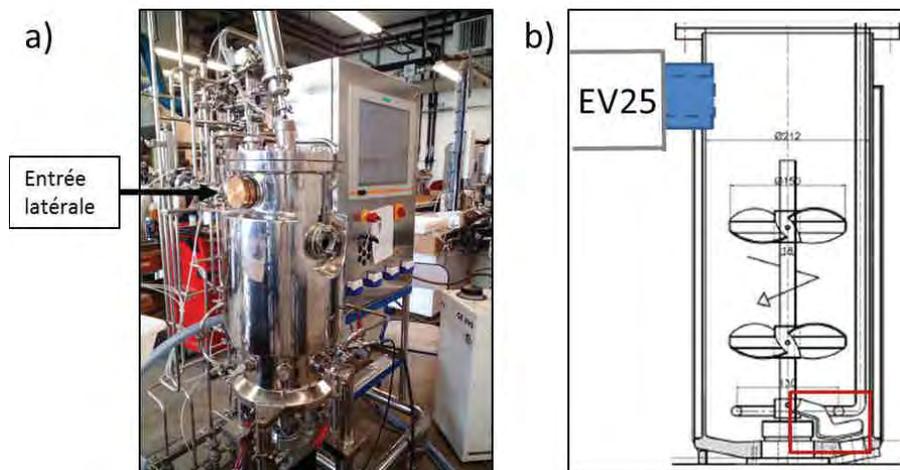
Le système Tornado™ est un équipement permettant le mélange efficace de solutions visqueuses. Il est composé d'un moteur, avec le système Tornado, un carrousel agitant et chauffant possédant un espace pour 6 ballons de 250mL. Le mélange à l'intérieur des ballons est assuré par des pales en forme d'ancre.



**Figure 4.4** Système Tornado employé pour des hydrolyses à haute consistance d'extrudats et bioextrudats

#### 4.1.6 Bioréacteur échelle pilote

Les études de saccharification et fermentation réalisées dans les installations à l'échelle laboratoire, avec un couplage avec l'EV25 ont été réalisées dans un bioréacteur de 22L utiles (Solaris, France) (**Figure 4.5a**). Le bioréacteur a été conçu avec une ouverture latérale afin d'être connecté directement à la sortie de l'extrudeur EV25. L'agitation est assurée par deux types de pales, une lame d'agitation au fond du réacteur et deux jeux de pales de type hélice marine (**Figure 4.5 b**). De même, le bioréacteur peut être stérilisé à haute pression. Il est équipé de sondes de température et de pH, ainsi que de 3 pompes péristaltiques. Le suivi de la température, le pH, le courant moteur et la vitesse d'agitation au cours du temps est réalisé par un système informatique dont le bioréacteur est équipé.



**Figure 4.5** Fermenteur de 22L dans les installations du LCA à Toulouse en photo (a) et représentation schématique de l'intérieur (b)

## 4.2 Méthodes

### 4.2.1 Fractionnement et bioextrusion en extrudeur bi-vis

Les essais de fractionnement menés dans les différents extrudeurs ont été réalisés en stabilisant successivement chaque phase de traitement. Le prétraitement alcalin est réalisé et stabilisé en premier avec l'injection de la solution alcaline. Après validation des débits sur des prélèvements d'au moins 15min et stabilisation de cette première phase, la solution acide est introduite. Le bouchon dynamique se forme et conduit au démarrage de la filtration. Une fois le régime stable atteint, les débits sont vérifiés, le pH est contrôlé au niveau du filtrat et de l'extrudat. La matière sèche de l'extrudat est mesurée afin de pouvoir calculer la dilution des enzymes à introduire dans la phase de bioextrusion. La solution enzymatique est alors introduite. Les débits sont de nouveau vérifiés. Une fois le régime stable atteint les prélèvements de matière ou le couplage avec le bioréacteur peuvent être réalisés.

### 4.2.2 Hydrolyses enzymatiques

#### 4.2.2.1 Conditions d'hydrolysabilité

On appelle « conditions d'hydrolysabilité » les conditions optimales d'hydrolyse enzymatique des substrats. Mener l'hydrolyse enzymatique dans ces conditions a pour but de quantifier l'accessibilité des enzymes à leur substrat. Les cocktails enzymatiques employés pour cela sont Cellic Ctec 2 et NS22002. Ils sont utilisés à 50°C qui est dans l'intervalle de leur température optimale d'activité. Les hydrolyses sont réalisées à faible consistance (5% (m/m)). La charge enzymatique est fixée à 15 FPU/g de matière sèche, et le cocktail Cellic Ctec 2 est complété avec du NS2002 à 10% sur une base protéique dans le but de garantir une charge enzymatique élevée et comportant une gamme large d'activités enzymatiques.

Les hydrolyses enzymatiques sont réalisées dans des tubes pyrex de 25mL. La réaction est suivie à 24h et 48h, chaque prélèvement est réalisé en triplicat. La masse totale de chaque tube est de 10g. Chaque tube comporte :

- 0,5g d'extrudat sec
- Tampon citrate-phosphate pH 5.0, 0,5M
- Azide de sodium, solution de à 2% (m/m) utilisée pour éviter des contaminations
- Cellic Ctec 2 et NS22002, dilués dans du tampon car ce sont des solutions visqueuses

Les tubes sont placés dans le bain marie chauffé à 50°C pendant 30min avant d'ajouter les enzymes. Chaque prélèvement est ensuite chauffé à 100°C pendant 10min puis dilué à 50mL et centrifugé. Le surnageant est filtré à 0,22µm puis analysé par HPIC.

Les résultats sont exprimés en fonction du taux de sucres libérés (Equations 4.1, 4.2 et 4.3) et les rendements du procédé sont calculés selon les Equations 4.4, 4.5 et 4.6:

$$GL = m \text{ glucose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ C dans extrudat} * 1.1 * 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$XL = m \text{ xylose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ H dans extrudat} * 1.1 * 100 \quad \text{Eq. 4.2}$$

$$SL = (m \text{ glucose} + m \text{ xylose libéré ((corrigés avec blanc))) / (m \text{ H dans extrudat} * 1.1 + m \text{ C dans extrudat} * 1.1) * 100 \quad \text{Eq. 4.3}$$

Où m glucose et xylose libérés correspondent aux masses produites après 24h ou 48h, exprimées en grammes et C et H correspondent aux masses de cellulose et hémicelluloses contenues dans 0,5g d'extrudat. Les valeurs 1,1 correspondent aux facteurs de conversion de glucanes en glucose (180/162) et des hémicelluloses en xylose et arabinose (150/132).

$$GR = m \text{ glucose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ CMD sec} * 100 \quad \text{Eq. 4.4}$$

$$XR = m \text{ xylose libéré (corrigé avec blanc)} / m \text{ CMD sec} * 100 \quad \text{Eq. 4.5}$$

$$SR = (m \text{ glucose} + m \text{ xylose libéré ((corrigés avec blanc))) / m \text{ CMD sec} * 100 \quad \text{Eq. 4.6}$$

Où m est la masse en grammes. La masse de CMD sec a été calculé de la manière suivante :  $m \text{ CMD sec} = \text{ratio} (Q_{\text{ext}}/Q_{\text{CMD}}) * 0.5\text{g}$ , où  $Q_{\text{ext}}$  est le débit sec d'extrudat et  $Q_{\text{CMD}}$  est le débit de CMD sec.

#### 4.2.2.2 Hydrolyse à haute consistance

##### 4.2.2.2.1 Hydrolyses enzymatiques dans l'incubateur thermostaté

La production de sucres à partir de bioextrudats et d'extrudats a été réalisée dans des tubes eppendorf® de 2mL, à 45°C et une agitation de 120rpm. Les hydrolyses ont été réalisées à une masse totale de 2g et une consistance de 20% (m/m) en diluant les bioextrudats et les extrudats avec du tampon citrate-phosphate pH 5 et 0.5mM. Il a été ajouté à chacun des échantillons 20µL d'azide de sodium à 2.0% (m/m) afin d'éviter des contaminations. Le suivi de la cinétique d'hydrolyse a été réalisé en préparant 3 tubes eppendorf prélevés à 0h, 3h, 24h et 48h. Les tubes sont par la suite portés à 100°C afin d'inactiver les enzymes. Le prélèvement est ensuite dilué dans un volume supérieur de 25 ou 50mL, puis il est centrifugé à 10000g pendant 2min. Le glucose et le xylose contenus dans le surnageant sont analysés par HPIC.

#### 4.2.2.2.2 *Hydrolyses enzymatiques dans Tornado™*

La production de sucres à partir de bioextrudats et d'extrudats a été réalisée dans des ballons de 100mL, à 45°C et une agitation de 30 rpm. Les conditions d'agitation ont été déterminées empiriquement, basées sur une agitation à laquelle le système ne bloquait pas. Les hydrolyses ont été réalisées à une masse totale de 60-150g et des consistances de 20%, 25% et 30% (m/m) en diluant les bioextrudats et extrudats avec du tampon citrate-phosphate pH 5 et 0.5mM. La consistance varie selon les expériences. 1% d'azide de sodium à 2% (m/m) a été ajouté à chacun des échantillons afin d'éviter des contaminations. Le suivi de la cinétique d'hydrolyse a été réalisé en prélevant des échantillons de 1g à différents temps d'hydrolyse. Chaque prélèvement est réalisé en duplicat ou triplicat, en s'assurant de ne pas prélever plus de 10% de la masse dans le ballon. Les tubes sont par la suite portés à 100°C afin d'inactiver les enzymes. Chaque prélèvement est par ensuite dilué dans un volume supérieur de 25 ou 50mL, puis il est centrifugé à 10000g pendant 2min. L'analyse du glucose et xylose contenus dans le surnageant a été réalisée par HPIC ou HPLC.

#### 4.2.2.2.3 *Hydrolyses dans agitateur orbital*

La production de sucres à partir de bioextrudats a été réalisée dans des erlenmeyers de 100mL à 50°C. Les hydrolyses ont été réalisées à une masse totale de 100g et des consistances de 20% (m/m) en diluant les bioextrudats avec du tampon citrate-phosphate pH 5 et 0.5mM. 1% (m/m) d'azide de sodium à 2.0% (m/m) a été ajouté à chacun des échantillons afin d'éviter des contaminations. Le suivi de la cinétique d'hydrolyse a été réalisé en prélevant des échantillons d'environ 1g à différents temps d'hydrolyse. Le prélèvement est par la suite dilué dans un volume supérieur de 10mL, puis il est centrifugé à 10000g pendant 2min. L'analyse du glucose et xylose contenu dans le surnageant a été réalisée par HPLC.

#### 4.2.2.2.4 *Saccharification dans réacteur de 22L Solaris*

Lorsque la saccharification du bioextrudat a été testée dans un réacteur de 22L, des prélèvements ont été réalisés après remplissage du bioréacteur. Les prélèvements ont été fait dans des tubes de 15mL ou 50mL, des aliquotes homogènes de 1.5g ont été réalisés puis dilués dans 25mL puis centrifugés à 10000g pendant 2min. Le surnageant a été filtré pour le dosage de glucose et xylose par HPIC ou HPLC.

#### 4.2.2.2.5 *Calcul du taux de conversion*

Lors de l'étape de bioextrusion, l'hydrolyse enzymatique est initiée et des sucres sont libérés sous forme d'oligomères ou de monomères, ce qui a pour conséquence une modification de la composition du bioextrudat. Ainsi, afin de ne pas induire de biais, les taux de glucose et de xylose libérés par hydrolyse enzymatique du bioextrudat ont été calculés en fonction de la quantité théorique de cellulose et d'hémicelluloses (déterminée par la technique d'ADF-NDF) contenue dans l'extrudat

produit avant injection de la solution enzymatique. De même, les cocktails enzymatiques contiennent du glucose et du xylose, il en sera tenu compte dans les calculs.

Pour le calcul du taux de sucres libérés, il est nécessaire de déterminer la partie de matière provenant de l'extrudat et celle correspondant à la solution enzymatique qui sont contenues dans l'échantillon de bioextrudat. Elles sont déterminées par les équations suivantes 3.1 et 3.2 :

$$m_{extrudat} = m_{bioextrudat} / Q_{bioext} * Q_{ext} \quad Eq. 3.1$$

$$m_{enzyme} = m_{bioextrudat} / Q_{bioext} * Q_{enz} \quad Eq 3.2$$

Où  $m_{extrudat}$  est la masse totale d'extrudat,  $m_{enzyme}$  est la masse de solution enzymatique et  $m_{bioextrudat}$  est la masse de bioextrudat utilisé comme substrat pour le prolongement de l'hydrolyse en réacteur batch.  $Q_{bioext}$  et  $Q_{ext}$  correspondent respectivement aux débits de bioextrudat et d'extrudat.

Les taux de conversion des sucres sont calculés par les équations 3.3 et 3.4 :

$$CG = m_{glucose\ libéré} / (m_{cellulose} * 1.11 + m_{glucose\ enzymes}) * 100 \quad Eq. 3.3$$

$$CX = m_{xylose\ libéré} / (m_{hémicelluloses} * 1.13 + m_{xylose\ enzymes}) * 100 \quad Eq 3.4$$

Où  $CG$  et  $CX$  correspondent respectivement aux taux de conversion en glucose et en xylose,  $m_{glucose\ produit}$  et  $m_{xylose\ produit}$  correspondent à la masse de sucres produits,  $m_{cellulose}$  et  $m_{hémicelluloses}$  à la masse de cellulose et d'hémicelluloses contenues dans l'extrudat,  $m_{glucose\ enzymes}$  et  $m_{xylose\ enzymes}$  correspondent aux sucres contenus dans les solutions enzymatiques.

#### 4.2.3 SSCF réalisée dans le réacteur de 22L Solaris

Les prélèvements ont été réalisés et préparés de la façon suivante : le prélèvement est fait dans un tube de 25 ou 50mL, taré au préalable, il est ensuite centrifuger pendant 7min à 5000g puis le surnageant est filtrer avec un filtre de 0.45µm pour le dosage HPLC. Le filtrat est récupéré dans un autre flacon et congeler. Le filtre en microfibre (Taille de diamètre 90mm, Art 6906941) est alors pesé. A l'aide d'un système Büchner, le culot est rincé et filtré avec de l'eau distillé, puis séché dans une étuve à 50-100°C. Le filtre est pesé une fois séché, le taux de matière insoluble est déterminé en suivant l'équation 4.24.

Une fois l'expérience menée dans le bioréacteur terminée, le moût de fermentation est récupéré et pesé, puis filtré par une maille de 1mm. La partie retenue par la maille est nommée « résidu ». La partie filtrée est centrifugée à 10000g pendant 10min à 10°C. Le surnageant ainsi que le culot de fond de réacteur sont récupérés. La composition du culot est enfin déterminée par la méthode décrite dans le point 0.

#### 4.2.4 Analyse chromatographiques

##### 4.2.4.1 Analyses par HPIC

Les sucres ont été analysés initialement par le système Thermo Scientific™ Dionex™ Integriion™ HPIC™ ICS 3000, avec une colonne CarboPac PA1 et un système de détection HPAE-PAD. Les sucres ont été analysés en utilisant une gamme étalon allant de 1-100mg/L de glucose et de xylose et un étalon interne, le fucose.

##### 4.2.4.2 Analyses par HPLC

Les analyses en HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) ont été réalisées avec une colonne de Aminex HPX-87H #1250140 de Bio Rad comportant sa pré-colonne avec un détecteur d'indice de réfraction. La pré-colonne et la colonne sont chauffées à 50°C, et la phase mobile est une solution d'acide sulfurique à 5mM. Le débit est fixé à 0,5mL/min. Les solutions standards utilisées sont des solutions de glucose et de xylose à des concentrations de 0,5g/L à 50 g/L, ainsi que de l'acide acétique de 0,02 g/L à 0,5 g/L.

#### 4.2.5 Analyse des extrudats et filtrats

##### 4.2.5.1 Teneur en humidité

La teneur en humidité des échantillons est mesurée selon la norme française NF V 03-903. Elle correspond à la perte en masse de l'échantillon jusqu'à sa stabilisation après chauffage à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  dans une étuve. La teneur en humidité ( $t_H$ ) est calculée selon l'équation 4.7. La teneur en matière sèche ( $MS$ ) de chaque matière est ensuite calculée à partir de la teneur en humidité ( $t_H$ ) par l'équation 4.8.

$$t_H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \quad \text{Eq. 4.7}$$

$$t_S = 1 - t_H \quad \text{Eq.4.8}$$

$m_0$  : la tare du creuset (g);  $m_1$  : la masse totale de l'échantillon et du creuset avant étuve (g) ;  $m_2$  : la masse totale de l'échantillon et du creuset après étuve

##### 4.2.5.2 Teneur en matières minérales et organiques

La teneur en matière minérale des échantillons est mesurée en accord avec la norme française NF V 03-322. Les échantillons sont calcinés dans un four à 550°C pendant 5h. Les résidus calcinés doivent se présenter comme une poudre de couleur gris clair. La teneur en matières minérales ( $t_M$ ) est exprimée en pourcentage de la matière sèche et est calculée selon l'équation 4.9. Le taux de matières organiques s'exprime lui d'après l'équation 4.10.

$$t_M = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad \text{Eq. 4.9}$$

$$t_O = 1 - t_M \quad \text{Eq. 4.10}$$

$m_0$  : la tare du creuset (g) ;  $m_1$  : la masse totale de l'échantillon et du creuset avant calcination (g);  $m_2$  : la masse totale de l'échantillon et du creuset après calcination (g)

#### 4.2.5.2 Composition en cellulose, hémicelluloses et lignines

La composition des extrudats a été estimée par la méthode de Van Soest and Wine., (1968) à l'aide d'un système d'appareillage Fibertec system – Hot Extractor. Toutes les analyses sont au moins réalisées en dupliquas (Van Soest et al., 1968).

- ADF ou NDF (1<sup>er</sup> traitement) :

Entre 0,8 et 1 g de matière sont pesés dans un fritté puis 100 ml de réactifs (ADF ou NDF) sont ajoutés et portés à ébullition. Le système de refroidissement est alors mis en marche et l'ensemble est maintenu à ébullition pendant 1 h. Après cette étape, le milieu réactionnel est filtré à travers les frittés et le rétentat lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition de la mousse. Le tout est ensuite séché suivant la norme NF V 03-903, pesé, puis minéralisé suivant la norme NF V 03 – 322 et pesé à nouveau.

- ADL (2<sup>ème</sup> traitement : attaque des lignines) :

Les frittés comportant le rétentat séché issus des traitements ADF sont mélangés à 25 ml de solution ADL. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 1h30 et mélangé de temps en temps. Après ce temps, les milieux sont filtrés et les rétentats sont lavés à la solution déminéralisant jusqu'à blanchissement, puis lavés à l'éthanol à 80%. Le tout est ensuite séché suivant la norme NF V 03-903, pesé, puis minéralisé suivant la norme NF V 03 – 322 et pesé à nouveau.

Composition des différentes solutions utilisées :

Pour 1 L de solution ADF :

- 1 L d'eau distillée.
- 20 g Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB).
- 26.8 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrée.

Pour 1 L de solution NDF :

- 1 L d'eau distillée.
- 30 g Sodium Lauryl Sulfate.
- 18.61 g Sodium tetra acetate ethylene diamine.
- 4.56 g Disodium phosphate.
- 6.81 g Sodium borate, 10H<sub>2</sub>O.
- 10 ml Ethylene glycol monoethyl ether.

Pour 1.5 L de solution ADL :

- 50 g de  $\text{KMnO}_4$  dans 1 L d'eau distillée
- 3 g de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  et 0,075g de  $\text{AgNO}_3$  dans 50 ml d'eau distillée.
- 5 g d'acétate de potassium dans 250 ml d'acide acétique pur.
- 200 ml de ter-butanol.

Pour 1 L de solution déminéralisant :

- 50 g d'acide oxalique déshydraté dans 700 ml d'éthanol 95%.
- 50 ml de HCl (35% ou 12N).
- 250 ml d'eau distillée.

Les taux de cellulose ( $t_C$ ), d'hémicelluloses ( $t_{HC}$ ) et de lignines ( $t_L$ ) dans la biomasse sont calculés par les formules suivantes :

$$t_C = \frac{m_{ADL1} - m_{ADL2}}{m_{ADL0}} \quad \text{Eq 4.11}$$

$$t_{HC} = \frac{m_{ADF1} - m_{ADF2}}{m_{ADF0}} - \frac{m_{NDF1} - m_{NDF2}}{m_{NDF0}} \quad \text{Eq 4.12}$$

$$t_L = t_C - \frac{m_{ADF1} - m_{ADF2}}{m_{ADF0}} \quad \text{Eq 4.13}$$

$m_{ADL0}$ : la masse sèche pesée avant traitement ADL;  $m_{ADL1}$ : la masse sèche pesée après traitement ADL. ;  $m_{ADL2}$ : la masse minérale pesée après traitement ADL;  $m_{ADF0}$ : la masse sèche pesée avant traitement ADF;  $m_{ADF1}$ : la masse sèche pesée après traitement ADF;  $m_{ADF2}$ : la masse minérale pesée après traitement ADF;  $m_{NDF0}$ : la masse sèche pesée avant traitement NDF;  $m_{NDF1}$ : la masse sèche pesée après traitement NDF;  $m_{NDF2}$ : la masse minérale pesée après traitement NDF

#### 4.2.5.3 Composition des biomasses en sucres simples

#### 4.2.5.4 Analyse des composants structurels de la biomasse lignocellulosique : protocole NREL

Les extractibles à l'eau ont été déterminés à l'aide du dispositif Dionex ESA 200 Accelerated Solvent Extractor (ASE) selon les conditions indiquées par le protocole (Sluiter et al., 2008). La matière débarrassée des extractibles à l'eau a été séchée et analysée en utilisant une adaptation du protocole (Sluiter et al., 2012). Pour cela,  $300,0 \pm 10,0$  mg de biomasse sont pesés dans un tube à hydrolyse résistant à la pression et préalablement taré,  $3,00 \pm 0,01$  ml (ou  $4,92 + 0,01$  g) d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés. Le tube est placé dans un bain marie à  $30 \pm 3$  °C et laissé pendant  $60 \pm 5$  min et la matière est mélangée toutes les 10min avec une tige en téflon. Les tubes sont retirés du bain marie et le mélange est dilué à une concentration en acide de 4% en ajoutant  $84,00 \pm 0,04$  ml d'eau distillée (pour un volume total de 86,73 ml). Les échantillons sont placés dans un autoclave pendant 1h à 121°C. L'hydrolysate est filtré par un creuset filtrant (ROBU filtering crucibles #20304, 30mL, porosity 4), préalablement séché et taré. Le creuset est placé à l'étude à 100°C pendant une nuit puis au four à 500°C pendant 15h. La lignine acido insoluble (AIL) est ainsi déterminée par l'équation 4.14.

$$\%AIL = \frac{(m_{\text{creuset}} - m_{\text{creuset avec résidu}}) - (m_{\text{creuset avec cendres}} - m_{\text{creuset}})}{m_{\text{echantillon sec initial}}} \quad \text{Eq 4.14}$$

Où  $m_{\text{creuset}}$  correspond à la masse du creuset sec vide,  $m_{\text{creuset avec résidu}}$  correspond à la masse obtenue du creuset avec le résidu après séchage par l'étuve

Un aliquot du filtrat de 50mL est conservé. Une partie du filtrat est analysée par spectrométrie UV-visible, dans notre cas l'analyse a été réalisée à une longueur d'onde de 320nm comme conseillé sur le protocole pour de la tige de maïs. L'échantillon a été dilué 5 fois et l'analyse a été réalisée en duplicat. La proportion de lignine acido soluble (ASL) de l'échantillon a été déterminée par l'équation 4.15.

$$\%ASL = \frac{UV\ abs \times Volume\ filtrat \times Dilution}{e \times m\ echantillon \times épaisseur\ de\ la\ couche} \quad \text{Eq 4.15}$$

Où UV abs correspond à l'absorbance moyenne, au volume de filtrat utilisé pour mesure, Dilution est le facteur de dilution du filtrat,  $\epsilon$  est l'absorbance à la longueur d'onde max (55 L/g/cm) et l'épaisseur de couche de la cuve employée

Une partie de ce filtrat est neutralisé jusqu'à pH 6 -7 avec du CaCO<sub>3</sub> et filtré avec une membrane de 0.22µm pour l'analyse du glucose, du xylose, du galactose, de l'arabionose et de l'acide acétique par HPLC.

#### 4.2.5.5 Analyse des sucres simples

Dans un tube à hydrolyse, 100mg d'échantillon sont pré-imprégnés dans 1,25mL d'acide sulfurique 72% pendant 30min à température ambiante. 13,5mL d'eau distillé sont ajoutés, et les tubes sont ensuite fermés et plongés pendant 30, 60, 90 ou 120 minutes dans un bain marie à 90°C puis refroidis dans un bain de glace. L'échantillon est neutralisé (6.5<pH<7.5) puis dilué dans un volume connu. La solution neutralisée est ensuite filtrée à l'aide d'une membrane de porosité 0,25µm. Une solution témoin d'arabinose, de galactose, de glucose, de xylose et de mannose à 500mg/L est aussi préparé et subit la même hydrolyse. La teneur en sucres des solutions est déterminée par HPIC.

#### 4.2.6 Analyse des protéines contenus dans les cocktails enzymatiques

L'analyse des protéines contenues dans les cocktails enzymatiques est réalisé avec le kit DC™ protein assay de Biorad (Biorad, France). Le cocktail Cellic Ctec 2 a été dilué 200, 500 et 1000 fois et le cocktail NS22002 200, 500 et 1000 fois. Les essais ont été réalisés en duplicat. Les essais ont été réalisés avec une gamme étalon de BSA de 0 à 1500 µg/mL.

#### 4.2.7 Méthodes de calcul

##### 4.2.7.1 Ratio L/S

Les ratios liquides/solides des différentes phases (prétraitement alcalin, neutralisation et bioextrusion) dans l'extrudeur sont déterminés d'après les équations suivantes :

$$L/S_b = \frac{Q_h \text{ CMD} + Q_h \text{ base}}{Q_s \text{ CMD} + Q_s \text{ base}} \quad \text{Eq 4.16}$$

$$L/S_a = \frac{Q_h \text{ CMD} + Q_h \text{ NAOH} + Q_h \text{ acide}}{Q_s \text{ CMD} + Q_s \text{ base} + Q_s \text{ acide}} \quad \text{Eq 4.17}$$

$$L/S_{enz} = \frac{Q_h \text{ CMD} + Q_h \text{ NAOH} + Q_h \text{ acide} - Q_h \text{ filtrat} + Q_h \text{ enzymes}}{Q_s \text{ CMD} + Q_s \text{ base} + Q_s \text{ acide} - Q_s \text{ filtrat} + Q_s \text{ enzymes}} \quad \text{Eq 4.18}$$

Où  $Q_h$  et  $Q_s$  sont respectivement le débit humide et le débit sec ; *Base*, *acide* et *enzymes* correspondent aux solutions d'alcalin, d'acide et d'enzymes

##### 4.2.7.2 Charge alcaline

La charge en alcalin est déterminée par l'équation 4.19 :

$$\text{Ratio base/CMDsec} = \frac{Q_s \text{ base}}{Q_s \text{ CMD}} \quad \text{Eq 4.19}$$

$Q_s \text{ base}$  : Débit en agent alcalin ;  $Q_s \text{ CMD}$  : Débit en Coproduit de maïs doux sec

Les charges en alcalin ont aussi été calculées en fonction de la molarité en ions  $\text{OH}^-$ , exprimé par le ratio  $\text{OH}^-/\text{CMS sec}$ . Pour chacune des bases employées ce ratio a été déterminé par l'équation 4.20 pour NaOH et KOH. Et par l'équation 4.21 pour  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  :

$$\text{Ratio OH}^-/\text{CMDsec} = \frac{Q_s \text{ base}/M(\text{base})}{Q_s \text{ CMD}} \quad \text{Eq 4.20}$$

$$\text{Ratio OH}^-/\text{CMDsec} = \frac{Q_s \text{ base}/M(\text{base}) \times 2}{Q_s \text{ CMD}} \quad \text{Eq 4.21}$$

$Q_s \text{ base}$  : Débit en agent alcalin ;  $Q_s \text{ acide}$  : Débit en agent acide ;  $Q_s \text{ CMD}$  : Débit en Coproduit de maïs doux sec ;  $M(\text{acide})$  : Masse molaire de l'acide ;  $M(\text{base})$  : Masse molaire agent alcalin

##### 4.2.7.3 Ratio base/acide

Le ratio base/acide déterminé pour la phase de neutralisation est déterminé par l'équation suivante :

$$\text{Ratio base/acide} = \frac{Q_s \text{ base}/M(\text{acide})}{Q_s \text{ acide} \times M(\text{base})} \quad \text{Eq 4.22}$$

$Q_s \text{ base}$  : Débit en agent alcalin ;  $Q_s \text{ acide}$  : Débit en agent acide ;  $M(\text{acide})$  : Masse molaire de l'acide ;  $M(\text{base})$  : Masse molaire agent alcalin

#### 4.2.7.4 Energie mécanique spécifique (EMS)

L'Energie Mécanique Spécifique ( $W \cdot h \cdot kg^{-1}$ ) (EMS) se calcule d'après l'équation 4.23 :

$$EMS = \frac{U \times I \times \cos \varphi \times \frac{N}{N_{max}}}{Q_S} \quad \text{Eq 4.23}$$

$I$  : Intensité mesurée (A) ;  $U$  : tension de la bis-vis (EV25 : 400 V et EV53 : 454V) ;  $N$  : vitesse de vis (rpm) ;  $N_{max}$  : vitesse de vis maximale (EV25 : 1200 rpm et EV53 : 800rpm) ;  $Q_S$  : débit d'entrée du solide ( $kg \cdot h^{-1}$ ) ;  $\cos \varphi$  : le rendement théorique du moteur de l'extrudeuse (EV25 : 0,9 et EV53 : 0,9)

#### 4.2.7.5 Calcul des solides Insolubles :

Le calcul des solides insolubles (SI) des prélèvements de fermentation dans le réacteur de 22L est le suivant:

$$SI = \frac{(m_{culot} - m_{culot\ séché})}{m_{culot}} \times 100 \quad \text{Eq 4.24}$$

SI : taux de solides insolubles ;  $m_{culot}$  : culot du prélèvement filtré avec le système Büchner ;  $m_{culot\ séché}$  : masse du culot filtré avec le système Büchner et séché à 50°C ou 100°C pendant une nuit

#### 4.2.7.6 Taux de remplissage global :

Les taux de remplissages globaux exposés pour le chapitre 2 ont été calculés à partir de l'équation 4.25

$$\text{Taux de remplissage global: } Q_S/SS \quad \text{Eq 4.25}$$

Où  $Q_S$  : Débit solide sec et  $SS$  : vitesse de vis



# Conclusion générale



## Conclusion générale

Ce travail de recherche, inscrit dans le cadre du projet BABET REAL 5, avait pour but d'une part de diminuer le coût relié à l'emploi de produits chimiques lors du prétraitement alcalin en extrusion bi-vis, et d'autre part d'étudier l'intégration, dans un procédé compact et semi-continu, des différentes étapes : prétraitement-saccharification-fermentation, en constituant ainsi une avancée dans l'échelle technologique.

La synthèse bibliographique présentée au premier chapitre met en évidence, le besoin croissant du développement des énergies durables, notamment dans le secteur des transports. D'une part, la prise de conscience des conséquences néfastes de l'utilisation des ressources fossiles sur l'environnement et l'être humain pousse les gouvernements et les institutions à prendre des mesures pour le développement d'alternatives énergétiques écologiques. D'autre part, les ressources pétrolières sont limitées et dans le cas de la France, ne constituent pas des ressources locales, ce qui contribue à une précarité énergétique. Au vue de ce contexte, de nombreuses alternatives sont étudiées telles que le bioéthanol, dont l'utilisation comme carburant et additif est déjà mise en place dans de nombreux pays. Cependant, la production de bioéthanol dite de première génération est associée, de nos jours, à de nombreuses problématiques environnementales et éthiques. C'est ainsi que le bioéthanol de deuxième génération, provenant de matière lignocellulosique non alimentaire, s'avère être une solution énergétique durable et disponible localement.

Toutefois, la production de bioéthanol de deuxième génération fait face à présent à des enjeux principalement d'ordre technologique qui rendent sa commercialisation coûteuse. Pour cette raison, des efforts scientifiques sont menés dans le but de développer des technologies performantes et à faible impact environnemental. Parmi ces technologies, le projet BABETHANOL (2010-2013) a permis la mise en place du procédé de CES (Combine Extrusion Saccharification) qui assemble plusieurs opérations dans un extrudeur bi-vis permettant d'obtenir un substrat hydrolysable par des enzymes. De plus, la production de bioéthanol par saccharification et fermentation de ce substrat est complémentée par la valorisation des coproduits (filtrats et vinasses) en biogaz et/ou en fertilisants. De cette manière, le projet vise la mise en place d'un procédé économiquement viable, à faible impact environnemental et local.

Le prétraitement alcalin en extrudeur bi-vis permet d'associer des actions thermomécaniques avec des actions chimiques. Dans ces conditions, les principaux effets sur la biomasse lignocellulosique de cette technologie sont : une augmentation de la surface accessible (résultant davantage de l'action

mécanique) et une solubilisation des lignines (résultant davantage du prétraitement alcalin). Dans le cas présent, le prétraitement est réalisé dans un réacteur unique en continu, auquel des étapes de neutralisation et filtration ont été ajoutées, permettant respectivement d'adapter le pH de la matière prétraitée pour les enzymes et d'éliminer des composés pouvant inhiber la saccharification ou la fermentation du substrat obtenu. De plus, dans le but d'amorcer une hydrolyse enzymatique dans des conditions de mélange intense, une étape innovante d'imprégnation des enzymes en extrusion bi-vis a été mise en place. De cette manière un procédé original, continue, modulable, adaptable à de nombreux types de biomasse et transférable à l'échelle industrielle a été mis en place.

Une des étapes les plus coûteuses du procédé est le prétraitement alcalin, son coût élevé est associé majoritairement au coût de l'alcalin et de l'acide. De cette manière, le chapitre 2 a été entièrement consacré à l'optimisation de cette étape par différentes stratégies. Parmi celles-ci, des essais préliminaires d'extrusion réactive alcaline en employant 3 types d'agents alcalins différents: NaOH, KOH et Ca(OH)<sub>2</sub> ont été menés. Cette étude a mis en évidence l'importance du choix de l'alcalin sur l'efficacité du prétraitement. NaOH et KOH ont notamment montré des performances supérieures à celle de la chaux en termes à la fois de solubilisation des hémicelluloses et des lignines et également d'hydrolyse enzymatique. Ces différences de comportement semblent liées à la limite de solubilisation de la chaux qui empêche une solubilisation totale de celle-ci sur le temps court de l'extrusion. Des essais préliminaires ont également permis de valider une autre stratégie qui consiste à diminuer la charge alcaline et de la compenser par une augmentation de la température.

Ainsi l'emploi de deux bases, KOH et NaOH ont été étudiées de manière approfondie au travers de l'étude de plan d'expérience ayant comme facteurs : la charge en alcalin et la température du prétraitement. Lors de ces essais, le procédé a été adapté pour la première fois à un extrudeur de type EV25. Dans le cas de KOH, l'étude de la modification de la charge en KOH et de la température de fourreau, a montré un effet majeure de la charge en alcalin, notamment sur la délignification et la solubilisation de la matière, ceci a également été relié à un meilleur rendement. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'utilisation de la soude mais un effet plus prononcé de la température a été repéré. Les résultats des plans d'expérience pour les deux bases ont fait ressortir l'importance de ces deux facteurs, sur l'efficacité du prétraitement mais aussi sur la stabilité du procédé. L'effet de la charge alcaline sur la solubilisation de composées lignocellulosiques est renforcé par l'effet de la température, affectant ainsi la performance du procédé de manière positive. Cependant, la destructuration intense de la matière affecte de manière négative l'étape de filtration et la conservation de la cellulose cruciale pour les étapes de saccharification et de fermentation. A la lumière de ces résultats, la performance du prétraitement en extrudeur bi-vis est finement modulé par différents facteurs qui n'ont pas été clairement déterminés et qui dépendent du type d'alcalin utilisé,

de la charge alcaline et de la température. Ainsi par exemple, l'évolution de la fraction ligneuse n'est pas clairement définie et celle-ci peut être impliquée dans des phénomènes d'inactivation des enzymes.

L'analyse économique et environnementale réalisée par les partenaires du projet a mis en évidence un avantage de l'utilisation de la soude comme agent alcalin. A partir des essais à menés l'échelle du laboratoire, le prétraitement alcalin a été testé à l'échelle pilote sur EV53. Les résultats de cet essai soulignent la possibilité de transfert du procédé à une échelle industrielle en employant les conditions de prétraitement préconisées avec NaOH et sans modification de l'efficacité de la destructuration.

A partir des résultats obtenus d'optimisation de prétraitement alcalin, il a été possible de mettre en place l'étude de l'intégration des étapes de prétraitement-bioextrusion-saccharification/fermentation. Le troisième et dernier chapitre concerne l'étude de l'implémentation de ces étapes à l'échelle laboratoire. Dans un premier temps, la bioextrusion a été appliquée à différentes conditions de ratio liquide/solide (L/S) et charges enzymatiques. Les essais ont permis de mettre en évidence des différences de comportement de l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses et de la cellulose menée en extrudeur et en réacteur fermé.

Lors de la bioextrusion, un effet prépondérant sur la solubilisation des hémicelluloses est observé quelques soient les conditions, toutefois une augmentation de la teneur en eau (par augmentation du ratio L/S) induit une solubilisation plus importante de cette fraction. Quant à la charge enzymatique, elle affecte de manière plus importante l'hydrolyse de la cellulose. De cette manière, le mélange intense des enzymes permet une hydrolyse des hémicelluloses et de la cellulose principalement sous forme d'oligomères. Les performances de l'hydrolyse enzymatique en extrusion sont ainsi sujettes à des facteurs tels que la teneur en eau et la charge enzymatique, qui pourraient eux même provoquer la modification d'autres facteurs, tels que la compression de la matière par l'augmentation du ratio L/S.

L'influence de la bioextrusion est toujours visible sur l'hydrolyse enzymatique poursuivie en réacteur fermé après sortie de l'extrudeur. La solubilisation des hémicelluloses pendant l'étape de bioextrusion permet ainsi de moduler les taux de conversion de la cellulose lors de la saccharification pendant les premières heures d'hydrolyse. La conversion du xylose est globalement améliorée lorsque le ratio L/S dépasse une valeur seuil (2,3-3). En ce qui concerne la hausse de la charge enzymatique, celle-ci favorise la cinétique de libération du glucose et du xylose, mais l'effet est limité jusqu'à une valeur seuil pour laquelle les taux de conversion ne sont plus augmentés.

La comparaison de la saccharification du bioextrudat et de l'extrudat a permis de faire ressortir l'effet positif de la catalyse enzymatique en extrudeur pour la production de sucres poursuivie dans des

réacteurs fermés. Il apparaît clairement que dans des conditions de ratio L/S et de charge enzymatique optimisées, la cinétique de saccharification et le taux maximal de conversion de glucose et de xylose sont améliorés par rapport à la saccharification d'un substrat non bioextrudé. En revanche, l'effet de la bioextrusion est modulé par les propriétés physico-chimiques de la matière initiale (notamment le rapport hémicelluloses/cellulose), dont il faudra tenir compte lors de l'adaptation du procédé.

L'implémentation du procédé en continu en employant un réacteur de 22L couplé à la sortie de l'extrudeur a fait ressortir les avantages et les limites du procédé. Le couplage de la bioextrusion à la saccharification-fermentation, permet une liquéfaction rapide (2-3h) et efficace de la matière dans le bioréacteur favorisant la libération de glucose qui est rapidement consommé par les levures (autour de 48h). Toutefois, la production totale d'éthanol est affectée par le faible rendement d'hydrolyse en xylose et une inhibition de la consommation du xylose par les levures. De ce fait, l'étude approfondie des causes provoquant ces effets pourrait permettre d'atteindre les objectifs de production éthanolique fixés par le projet. Par ailleurs, une fraction non hydrolysée et insoluble est retrouvée au fond du bioréacteur malgré les bonnes conditions de mélange. Cette fraction est en grande partie composée de granulés (>1mm) avec une structure fortement récalcitrante et riche en polysaccharides (45% de cellulose et 45% d'hémicelluloses).

Il est à remarquer que les différentes expériences retrouvées dans ce manuscrit ont été réalisées avec des lots de matière différents et présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes liées à leur mode de séchage, mais provenant d'une même variété et d'un même fournisseur. Malgré ces différences de la matière première le procédé de déstructuration développé est assez robuste pour obtenir un substrat suffisamment accessible par les enzymes et pouvant être fermenté. Il est toutefois à noter que dans le cas de matières lignocellulosiques très riches en hémicelluloses, il sera préférable d'adapter les conditions de bioextrusion afin de favoriser une hydrolyse complète de cette fraction.

Ces travaux de recherche ouvrent des perspectives de travail pour atteindre un procédé durable de déstructuration de la matière en extrusion bi-vis.

Bien que le coût des produits chimiques ait été diminué par la réduction de la concentration en alcalin et en acide employées, le coût et l'impact écologique pourraient être encore réduits par le recyclage de la liqueur noire du filtrat. La liqueur noire correspond à la fraction liquide du filtrat. Dans certaines études, la réutilisation de la liqueur noire obtenue après prétraitement de la lignocellulose avec de la soude ou de la potasse a permis d'obtenir un procédé utilisant moins d'agent alcalin et moins d'eau tout en conservant un effet positif sur la déstructuration de la matière.

De plus en ce qui concerne, l'estimation des coûts reliés au prétraitement, les prix des réactifs chimiques correspondent à des prix pour des réactifs purs. Il serait ainsi intéressant de réaliser cette estimation en utilisant des réactifs dilués dont le prix est généralement plus faible.

Les résultats de prétraitement alcalin en employant la soude ont mis en évidence une diminution de la performance du prétraitement probablement liée au comportement de la lignine à haute température. Il serait ainsi intéressant de réaliser des études sur les lignines dans ces conditions. Notamment, des essais de microscopie pourraient indiquer s'il y a formation de gouttelettes de lignines ou pseudo-lignines.

Les essais de fermentation dans le bioréacteur de 22L indiquent qu'une partie de la biomasse est difficilement hydrolysable et s'accumule au fond du réacteur. Cette fraction correspondrait à une fraction « grain dur » retrouvée dans la matière initiale et provenant probablement des rafles. L'élimination de cette fraction par un tamisage avant introduction dans le procédé pourrait permettre d'augmenter les rendements en éthanol par rapport à la matière traitée. Cette fraction pourrait par la suite être valorisée pour d'autres applications telles que dans le domaine des matériaux ou des abrasifs comme c'est déjà le cas dans la filière maïs dur.

De plus, la totalité de la fraction solide non hydrolysée lors de la saccharification-fermentation, composée des granulés de taille supérieure à 1mm et du culot obtenu par centrifugation de l'hydrolysate, pourrait être récupéré et retraité à nouveau par le procédé de prétraitement alcalin en extrudeur bi-vis et bioextrusion. Notamment, le résidu granuleux contient au moins 20% du glucose et 30% du xylose initialement introduits dans le bioréacteur. De cette manière, la totalité de la matière serait traitée afin d'augmenter le revenu en éthanol.

Les faibles rendements en xylose lors de la saccharification du lot de CMD 3 montrent une possible inhibition ou manque de  $\beta$ -xylosidases pouvant hydrolyser les oligomères produits lors de la bioextrusion. L'augmentation du taux de conversion en xylose pourrait ainsi améliorer les rendements en éthanol. Toutefois, l'inhibition de consommation de xylose par les levures peut être de nature différente que celle de l'hydrolyse enzymatique. Notamment, il pourrait d'après les études de l'INSAT s'agir d'une inhibition par des sels inorganiques qui seraient encore présents à une concentration trop importante malgré la filtration. Une solution pourrait être d'augmenter le ratio L/S de la phase de neutralisation afin de favoriser l'élimination des sels au filtrat et ainsi diminuer la concentration en sels inorganiques dans le bioextrudat. L'utilisation de tampon apporte aussi des sels, il est ainsi préconisé pour le développement futur du procédé de limiter l'utilisation du tampon lors de la bioextrusion et de n'utiliser que de l'eau lorsqu'il s'agit d'ajuster la concentration dans le bioréacteur.



## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> Emissions de CO <sub>2</sub> provenant de la combustion de carburants fossiles à échelle globale (IEA, 2018).....	22
<b>Figure 1.2</b> CO <sub>2</sub> émissions par secteur et par région ; données de 2016 (IEA, 2018) *Transport n’inclut pas les soutes internationales maritimes ni d’aviation.....	22
<b>Figure 1.3</b> Importation de pétrole brute en France entre 1990 et 2016 en tonnes (IEA, 2018) .....	22
<b>Figure 1.4</b> Capacité d’énergie de production des différentes énergies renouvelables dans le monde en 2017, les pourcentages font référence à la capacité de chacune des technologies en fonction de la capacité totale (IRENA, 2018).....	23
<b>Figure 1.5</b> Production et prédiction de biocarburants de première génération conventionnelle par région entre 2009 et 2023 (IEA, 2018) .....	27
<b>Figure 1.6</b> Niveau technologique de différentes technologies de biocarburants de 2 <sup>ème</sup> génération, les couleurs indiquent les procédés de conversion : hydrolyse (vert), pyrolyse (bleu), hygrothermique (pourpre) et gazéification (rouge) (IRENA, 2016).....	29
<b>Figure 1.7</b> Schéma de la production d’éthanol à partir de matières premières sucrières (Zahed et al.,2017).....	30
<b>Figure 1.8</b> Schéma de la production d’éthanol à partir de matières premières amidonnées (Zahed et al.,2017).....	31
<b>Figure 1.9</b> Différentes sources de biomasse lignocellulosique (Wiloso et al., 2012 ; Zahed et al.,2016) .....	33
<b>Figure 1.10</b> Schéma de production de bioéthanol à partir de biomasses lignocellulosique (Zahed et al. 2016).....	38
<b>Figure 1.11</b> Principaux composants et structure de la biomasse lignocellulosique. Gl : acide gluconique; Fer : acide ferulique (Isikgo et Becer, 2015).....	39
<b>Figure 1.12</b> Schéma de l’ultrastructure d’une cellule modèle de bois. Les différentes couches sont : la couche primaire (P), couche secondaire (S), lamelle moyenne (ML). L’orientation des microfibrilles de cellulose est indiquée (Côté, W.A. 1977) .....	40
<b>Figure 1.13</b> Structure moléculaire de la cellulose (n= degré de polymérisation (DP))(Klemm et al.,2005) .....	40
<b>Figure 1.14</b> Schéma de l’organisation de la cellulose au sein de la paroi cellulaire végétale (a), la paroi secondaire (b), microfibrille (c), chaînes de glucane (d) et cellobiose (e) (Laureano-Perez et al., 2005 de l’American Society of plant Biology ).....	41
<b>Figure 1.15</b> Structure de la cellulose montrant les liaisons hydrogènes intramoléculaires (a et b) et intermoléculaires (c) (H.A. Krassig.,1993) .....	41
<b>Figure 1.16</b> Microfibrilles contenant environ 15-40 molécules de cellulose séparées par des zones cristallines et para-cristallines ou amorphes (Sun., 2010) .....	41
<b>Figure 1.17</b> Différents traitements d’obtention des polymorphes de cellulose (O’Sullivan, 1997) .....	42
<b>Figure 1.18</b> Principaux constituants des hémicelluloses (Ren and Sun, 2010) .....	43
<b>Figure 1.19</b> Types d’hémicelluloses et leur chaînes principales, retrouvés dans les différents types de biomasse lignocellulosique ; AG :Arabinogalactane ; GGM : Galactoglucomannane. GM : Glucomannane ; AGX : Arabinoglucuronoxylane ; GX : Glucuronoxylane ; XG : Xyloglucane ; GAX : Glucuroarabinoxylane ; AX : Arabinoxylane (Girio et al., 2010).....	44
<b>Figure 1.20</b> Structure d’un L-arabino-D-xylane soluble (Ebringerová et al., 2005).....	44
<b>Figure 1.21</b> Modèle d’organisation de la paroi végétale des graminées, les molécules d’hémicelluloses (bleu) se lient à des sections du microfibrille de cellulose (en jaune) par des liaisons hydrogènes (Marriott et al.,2016).....	45
<b>Figure 1.22</b> Les 3 monolignols primaires des lignines alcool p-coumaryl (MH), alcool coniferyl (MG) et alcool sinapyl (MS) et unités au sein de la lignine structurale, unités de p-hydroxyphenyl (PH), guaiacyl(PG), et syringyl (PS) (Ralph et al., 2004).....	46

<b>Figure 1.23</b> Fraction des lignines avec plusieurs liaisons C-O et C-C (Brandt et al.,2013) .....	46
<b>Figure 1.24</b> Complexes entre les lignines et les polysaccharides impliquant des liaisons avec l'acide ferulique (à gauche). Le réseau qui en découle (à droite) (Brant et al., 2013) .....	48
<b>Figure 1.25</b> Modèle classique de la dégradation enzymatique de la cellulose (Belin, 2013) .....	49
<b>Figure 1.26</b> Modèle classique de la dégradation enzymatique des hémicelluloses (Beliner, 2013) ....	50
<b>Figure 1.27</b> Représentation des structures obtenues par cristallinité des sites catalytiques d'une exoglucanase (a), une endoglucanase et une glycanase (c) (Juturu and Wu, 2014) .....	50
<b>Figure 1.28</b> Rupture de la cellulose par les LPMO (Horn et al.,2012) .....	51
<b>Figure 1.29</b> Model de dégradation de la cellulose. EG : Endoglucanase ; CBH : Cellobiohydrolase ; CDH : Cellobiose-dehydrogenase ; CBM : Carbohydrate binding Module ; GH61 est une LPMO (Horn et al., 2012).....	51
<b>Figure 1.30</b> Eléments structuraux contribuant à la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique (Zhu et al., 2008).....	52
<b>Figure 1.31</b> Perturbations causées par la lignine. La lignine (jaune) inhibe l'action des cellulases (rouge) sur la cellulose (vert) par l'encombrement stérique en réduisant l'accès au substrat, par adsorption non-spécifique des cellulases de façon directe ou indirecte (Donohoe and Resch, 2015).....	53
<b>Figure 1.32</b> Représentation des échelles de porosité, du lumen aux pores entre les microfibrilles (Viamajala et al., 2010).....	56
<b>Figure 1.33</b> Facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique à haute consistance (Chen et al., 2017) .....	58
<b>Figure 1.34</b> Prétraitements souvent utilisés sur la biomasse lignocellulosique (Alvira et al., 2010)....	62
<b>Figure 1.35</b> Schéma des différents équipements utilisés pour le prétraitement mécanique et les stress mis en place (Barakat et al., 2014) .....	63
<b>Figure 1.36</b> Complexe lignine-polysaccharide (LCC) de la paroi végétale des résidus de graminée et clivage par un agent alcalin (Buranov and Mazza, 2008) .....	66
<b>Figure 1.37</b> Schéma d'une extrudeuse, Clextal .....	69
<b>Figure 1.38</b> Schéma des caractéristiques des vis (Clextal, France).....	70
<b>Figure 1.39</b> Schéma représentant les sections de vis conjuguées (Clextal) .....	70
<b>Figure 1.40</b> Inhibiteurs de la fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).....	83
<b>Figure 1.41</b> Schéma représentant différentes modes de conduite de saccharification et la fermentation utilisés pour la production de bioéthanol lignocellulosique ; SHF :Separated Hydrolysis and Fermentation ou Hydrolyse et Fermentation Séparées ; la SSF :Simultaneous saccharification and fermentation ou Saccharification fermentation simultanée ; la SSFC : Simultaneous saccharification and co-fermentation ou Saccharification co-fermentation simultanées ; la CPB : Consolidated Bioprocessing ou Bioprocédé consolidé et la SSFF : Simultaneous Saccharification, filtration and fermentation ou Saccharification, filtration, fermentation simultanés.....	85
<b>Figure 1.42</b> Schéma illustratif de l'organisation de ce travail de thèse.....	89
<b>Figure 2.1</b> Schéma du procédé de traitement des épis de maïs doux dans l'industrie de conserverie (Mokoumbou, 1988) .....	110
<b>Figure 2.2</b> Représentation de plante de maïs (Zea Mays) et coupe transversale de l'épi, en rouge encadrés les principaux constituants des coproduits de conserverie de maïs doux, figure adaptée des archives Larousse .....	111
<b>Figure 2.3</b> Hydrolysabilité des lots de SCC : lot 1 (bleu), le lot 2 (rouge) et le lot 3 (gris), les résultats sont exprimés en taux de sucres libérés (a) et en rendement (b) à 24h et 48h ; GL : Glucose Libéré ; XL : Xylose Libéré ; SL RG : Rendement du Glucose ; RX : Rendement du Xylose ; RS : Rendement en Sucres .....	114
<b>Figure 2.4</b> Photos du lot de matière 3 avant et après broyage avec grille de 6mm .....	115
<b>Figure 2.5</b> Pourcentage cumulé en fonction de la taille du tamis .....	100
<b>Figure 2.6</b> Schéma représentatif de la configuration de l'extrudeur BC21 employée lors de cette étude avec un zone de prétraitement alcalin (jaune), une zone de neutralisation (bleu) et de filtration....	118

<b>Figure 2.7</b> Composition des extrudats exprimés en % de matière sèche (MS)(a) en fibre Insoluble (FI) , Cellulose (C), Hémicelluloses (H) et Lignines (L) et bilans matière obtenus pour 100Kg de CMD sec introduit (b) pour un prétraitement mené à 130°C et 150°C avec différents agents alcalins à une concentration en OH <sup>-</sup> de 1,55-1,7 mol/Kg de CMD sec.....	122
<b>Figure 2.8</b> Hydrolysabilité des extrudats après 48h obtenus en utilisant différentes bases à une concentration de 6.0% en g de NaOH équivalents pour 100 g de matière sèche et des températures de fourreau de 130°C et 150°C ; Note : GL : Glucose Libéré ; XL ;Xylose libéré ; SL : Sucres Libérés.....	123
<b>Figure 2.9</b> Résultats de la composition des extrudats fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignines (L) (a) et du bilan matière pour 100Kg de matière sèche entrante de l'extrudat (b) .	126
<b>Figure 2.10</b> Hydrolysabilité des extrudats obtenus avec une température de fourreau à 150°C et des concentrations croissantes en OH-/CMD (%Kg/Kg) .....	127
<b>Figure 2.11</b> Composition des extrudats fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignine (L) (a) et bilan matière pour 100Kg de matière sèche entrante de l'extrudat (b).....	129
<b>Figure 2.12</b> Hydrolysabilité des extrudats obtenus avec une température de fourreau à 150°C et des concentrations croissantes en NaOH/CMD.....	130
<b>Figure 2.13</b> Schéma de la configuration employée pour l'étude de l'impact de la température (T) et la charge en alcalin sur le prétraitement avec KOH.....	132
<b>Figure 2.14</b> Plan d'expérience théorique (bleu) et expérimental (rouge) pour étude de l'influence de la température et de la charge en alcalin exprimée en OH-/CMD sec (a) et en KOH/CMD sec (b).....	134
<b>Figure 2.15</b> Conditions de neutralisation du CMD prétraité utilisé obtenir un pH proche de 5 en fonction du ratio OH-/CMD sec pendant les essais en erlenmeyer .....	134
<b>Figure 2.16</b> Courbes d'iso réponse indiquant la matière sèche (%)(a), la fibre insoluble (FI)(%MS)(b), (c), la cellulose (%FI) (c) les hémicelluloses (%FI)(d) dans l'extrudat de hémicelluloses retirées (HR)(%)(e) et le taux de délignification (DL)(%) (f) et; les points en blanc marqués correspondent aux résultats des essais 1 à 10 .....	140
<b>Figure 2.17</b> Photos des extrudats obtenus pour les essais menés dans le cadre du plan d'expérience avec KOH et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	142
<b>Figure 2.18</b> Taux de sucres libérés après 24h (a) et 48h (b) d'hydrolyse enzymatique, chaque essai a été placé sur les graphiques en fonction de la température de fourreau mesurée et le ratio KOH/CMD sec, les valeurs en étiquette correspondent : au numéro de l'essai, le taux de GL, le taux XL et le taux de SL (glucose et xylose libérés) ; en rouge est délimitée la zone de filtration instable et les essais encadrés en pointillés correspondent aux les valeurs les plus élevées .....	145
<b>Figure 2.19</b> Graphiques de corrélation entre le taux d'hémicelluloses dans la fibre insoluble des extrudats et le taux glucose libéré (a), xylose libéré (b) et sucres libérés (c) obtenus après 48h, pour cette corrélation les données des essais 2 et 7 ont pas été pris en compte .....	147
<b>Figure 2.20</b> Courbes d'iso réponse représentant les rendements de glucose (RG), rendements en xylose (RX) et rendements en sucres (RS) après 48h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la température et du ratio KOH/CMD sec ; les points en blanc représentent les essais expérimentaux .....	148
<b>Figure 2.21</b> Profils de vis testés pour la mise en place du prétraitement thermo-mécano-chimique dans l'extrudeur de type EV25 avec NaOH comme agent alcalin et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pour la neutralisation .....	152
<b>Figure 2.22</b> Configuration et profil de vis utilisé pour l'étude de l'influence de la température et du ratio NaOH/CMD sec sur du coproduit de maïs doux ; TP : Sondes de température .....	153
<b>Figure 2.23</b> Domaine expérimental de l'impact de la charge en alcalin et la température, la charge en alcalin est exprimé en OH-/CMD sec (a) et son équivalent en NaOH/CMD sec (b) ; le domaine	

expérimental est représenté par le cercle noir, les points théoriques en bleue et les points expérimentaux en rouge ..... 155

**Figure 2.24** Schematic diagram of the modular barrel of EV25 twin-screw extruders; N.C.: Non-controlled; TP: Temperature probe ..... 160

**Figure 2.25** Iso response curves indicating Insoluble Fiber (%DM) (a), hemicelluloses fraction (%IF) (b), cellulose fraction (%) (c) and hemicelluloses removal rate (%) (d) as function of the temperature (T) and NaOH/SCC ratio. The circles represent the experimental results ..... 166

**Figure 2.26** Iso response curves indicating solid dry matter (DM) of extrudate (a) and mineral matter (MM) of the filtrate (b) as function of the temperature (T) and the NaOH/SCC ratio, the circles represent the experimental results ..... 169

**Figure 2.27:** Iso response curves indicating xylose released rate (%) (% of xylose released/g of hemicelluloses in extrudate)(a), xylose yield (XY)(% g of xylose released/g of dry SCC)(b) and glucose yield (GY)(% g of glucose released/g of dry SCC)(c). The circles represent the experimental results 172

**Figure 2.28** Taux de sucres libérés (a) et rendement (b) après 24h et 48h d'hydrolyse enzymatique en conditions d'hydrolysabilité pour les extrudats par prétraitement avec KOH et NaOH ; GL : Glucose Libéré ; XL : Xylose Libéré ; SL : Sucres libérés ..... 177

**Figure 2.29** Configuration et profil de vis utilisé pour l'étude de l'influence de la température et du ratio NaOH/CMD sec sur du coproduit de maïs doux ; SP : Sondes de température ..... 179

**Figure 2.30** Taux de remplissage des vis pendant le prétraitement à la soude et la neutralisation à l'acide sulfurique de l'extrudeur EV53 ..... 182

**Figure 2.31** Bilan massiques pour 100Kg de CMD sec à l'échelle laboratoire et pilote ..... 184

**Figure 2.32** Hydrolyse enzymatique de la matière non traité (CMD brut-5%) et de l'extrudat obtenu à échelle pilote (EV53-5%) dans les conditions d'hydrolysabilité à 5% (m/m) de consistance et de extrudat obtenu à l'échelle pilote (EV53-25%) et de l'extrudat obtenu avec l'EV25 (EV25-25%) à 25% (m/m) de consistance après 24h et 48h ..... 185

**Figure 3.1** Schéma de la configuration et du profil de vis employé pour les expériences de bioextrusion sur EV25, les températures indiquées correspondent aux températures de consigne des fourreaux ; TP : Sonde de température ..... 195

**Figure 3.2** Photo de l'extrudeur EV 25 lors des expériences de bioextrusion ..... 196

**Figure 3.3** Représentation schématique des expériences de bioextrusion ; A : production de l'extrudat ; B : production du bioextrudat ; C : Saccharification de l'extrudat avec ajout des enzymes et du bioextrudat ..... 197

**Figure 3.4** Photos du système Tornado™ employé pour cette étude ..... 199

**Figure 3.5** Composition de la fibre insoluble des bioextrudats et de l'extrudat (a) et hémicelluloses solubilisées d'après le bilan massique (b) lors de la modification de la teneur en eau de la phase de bioextrusion avec une charge enzymatique de autour de 14 g de protéine/Kg d'extrudat sec ..... 203

**Figure 3.6** Composition de la fibre insoluble des bioextrudats et de l'extrudat (a) et hémicelluloses retirées d'après le bilan massique (b) lors de la modification de la charge enzymatique avec un ratio L/S de 2,3 ..... 206

**Figure 3.7** Taux de conversion en glucose (CG) (a) et en xylose (CX) (b) des bioextrudats obtenus à différents ratios L/S enz de bioextrusion (trait plein) et de l'extrudat (trait en pointillés) après sortie de l'extrudeur ..... 209

**Figure 3.8** Relation entre le taux de conversion en glucose (CG)(a) et le taux de conversion en xylose (CX)(b) à 24h et 48h avec le taux d'hémicelluloses solubilisées pendant la bioextrusion dans le cas de bioextrusion avec le lot de CMD 2 ..... 212

<b>Figure 3.9</b> Taux de conversion du glucose (CG)(a) en fonction de la charge en cellulase (7, 10 et 15 FPU/g d'extrudat sec) et du xylose (CX)(b) en fonction de la charge en xylanase (605, 847 et 1275 UI/g d'extrudat sec) obtenus par l'hydrolyse de l'extrudat obtenu par prétraitement du lot de CMD 3 à 20% de consistance .....	213
<b>Figure 3.10</b> Taux de conversion en glucose (CG)(a) et xylose (CX)(b) des bioextrudats obtenus par les essais 14 à 18 en agitateur orbital et de l'extrudat complétement en Cellic Ctec 2 avec la même charge enzymatique que le bioextrudat 14 (E14) et le bioextrudat 15 (E15) en système Tornado .....	213
<b>Figure 3.11</b> Comparaison des taux de conversion en glucose (CG) (a) et en xylose (CX) (b) entre l'extrudat et le bioextrudat obtenus avec le CMD 2 à 24h et 48 d'hydrolyse enzymatique en réacteur orbital agité à 20% de consistance.....	216
<b>Figure 3.12</b> Taux de conversion en glucose (CG) (a) et en xylose (CX)(b) à 20% de consistance en agitateur orbital en employant des charges en cellulase de 3, 6, 13 et 19 FPU/g d'extrudat et 254, 531, 1077 et 1577 UI/g d'extrudat sec et un ratio L/S enz de 1,4 pour la bioextrusion en employant le lot de CMD 2 .....	217
<b>Figure 3.13</b> Concentration en éthanol (cercle), glucose (carrés) et xylose (triangles) lors de la SSCF des bioextrudats produits lors des essais 14 (noir), 15 (bleue) et 17 (vert) avec le lot de CMD 3 menées par l'INSAT à 20% de consistance et 30°C avec la levure Cellux 4.....	218
<b>Figure 3.14</b> Concentration en éthanol (cercle), glucose (carrés) et xylose (triangles) lors de la SSCF des bioextrudats produits lors des essais 19 (jaune), 20 (orange), 21 (gris) et 22 (bleue) à partir du CMD 2 menées par l'INSAT à 20% de consistance et 30°C avec la levure Cellux 4.....	218
<b>Figure 3.15</b> Couplage de l'extrudeur EV25 et du bioréacteur de 22L en vue d'ensemble (a) et vue de l'intérieur du réacteur lors du remplissage (b) .....	220
<b>Figure 3.16</b> Taux de conversion du glucose (CG) et du xylose (CX) et leur concentrations au cours de la saccharification à une consistance de 21,4% et 40°C dans le bioréacteur de 22L.....	221
<b>Figure 3.17</b> Taux de conversion en glucose (CG) et en xylose (CX) du bioextrudat obtenu lors de l'essai 3.3.3.3 à 20% de consistance, 45°C pendant 48h d'hydrolyse dans le réacteur Tornado™ .....	222
<b>Figure 3.18</b> Puissance d'agitation pour atteindre 300 tpm au cours des premières 16h d'utilisation du réacteur .....	224
<b>Figure 3.19</b> Photos de l'intérieur du bioréacteur à la fin de la charge du bioréacteur (a) et 3h après la charge du bioréacteur (b).....	225
<b>Figure 3.20</b> Concentration en glucose, xylose et éthanol obtenus au cours de l'essai 1 de saccharification-fermentation dans le réacteur de 22L à 30% de consistance (m/m) en employant la levure Cellux 4 .....	225
<b>Figure 3.21</b> Bilan massique du moût de fermentation obtenu après 7 jours de saccharification et fermentation de l'essai 1.....	225
<b>Figure 3.22</b> Photo des fractions insolubles récupérées après SSCF du culot du moût de fermentation filtré et du résidu du moût de fermentation sans extractibles à l'eau et séchés .....	226
<b>Figure 3.23</b> Organisation de l'essai pendant les premières heures.....	228
<b>Figure 3.24</b> Puissance d'agitation mesurée du réacteur pendant les premières heures de l'essai 2 de saccharification et fermentation dans le bioréacteur.....	229
<b>Figure 3.25</b> Concentration en glucose, xylose et éthanol obtenus au cours de l'essai 2 de saccharification-fermentation dans le bioréacteur de 22L à 20% de consistance (m/m) en utilisant la levure Cellux 4 .....	229
<b>Figure 3.26</b> Bilan massique des matières insolubles dans le moût de fermentation .....	231
<b>Figure 3.27</b> Bilan de glucose et xylose de l'essai 2 de saccharification-fermentation.....	231
<b>Figure 3.28</b> Bilan des matières nécessaires pour produire un kilo d'éthanol selon les conditions de l'essai 1 et 2 de saccharification-fermentation .....	232

<b>Figure 4.1</b> Photos des extrudeurs employés pour cette thèse : BC21 (a) et EV25 (b) dans les installations à Toulouse et EV53 (b) dans les installations à Tarbes.....	242
<b>Figure 4.2</b> Bain marie utilisé pour les expériences d'hydrolysabilité.....	244
<b>Figure 4.3</b> Incubateur utilisé pour expériences d'hydrolyse à haute consistance.....	244
<b>Figure 4.4</b> Système Tornado employé pour des hydrolyses à haute consistance d'extrudats et bioextrudats .....	245
<b>Figure 4.5</b> Fermenteur de 22L dans les installations du LCA à Toulouse en photo (a) et représentation schématique de l'intérieur (b).....	245

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> Biocarburants liquides en fonctions de la source et du moyen de production (Oumer et al., 2018).....	25
<b>Tableau 1.2</b> Principes pour les biocarburants version 0.5 (Solomon, 2010) .....	26
<b>Tableau 1.3</b> Propriétés physico-chimiques du diesel, de l'essence et de l'éthanol (Agarwal, 2007) ...	29
<b>Tableau 1.4</b> Exemples de production de biomasse lignocellulosique par type de biomasse et région (Carroll and Somerville, 2009a; Khoo, 2015).....	32
<b>Tableau 1.5</b> Composition de la biomasse lignocellulosique de quelques espèces végétales (Benjamin et al., 2013; Carroll and Somerville, 2009b; Cayetano and Kim, 2018; Zhu and Pan, 2010).....	36
<b>Tableau 1.6</b> Tableau récapitulatif des principaux avantages et désavantages pour la production de bioéthanol des principales sources de biomasse lignocellulosique.....	37
<b>Tableau 1.7</b> Composition des hémicelluloses de différentes parties issus de maïs dur (Cai et al., 2016) .....	45
<b>Tableau 1.8</b> Caractéristiques des lignines dans différents types de biomasse (Barakat et al., 2014) ..	47
<b>Tableau 1.9</b> Facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique à haute consistance et stratégies potentielles pour les surmonter avec leur désavantages (Che et al., 2017) .....	60
<b>Tableau 1.10</b> Avantages et désavantages des prétraitements utilisés pour la production de bioéthanol SSA : Surface Spécifique Accessible.....	68
<b>Tableau 1.11</b> Types de vis utilisées en extrusion bi-vis dans cette étude .....	70
<b>Tableau 1.12</b> Prétraitement de matières lignocellulosiques en extrudeur bi-vis et effets observés ...	72
<b>Tableau 1.13</b> Caractéristiques essentielles et souhaitables pour le choix sur le microorganisme de la fermentation (Zaldivar et al., 2001) .....	81
<b>Tableau 1.14</b> Avantages et désavantages des procédés de mise place de la saccharification et de la fermentation .....	86
<b>Tableau 2.1</b> Comparaison entre soude, potasse et chaux (Rodrigues et al., 2016).....	108
<b>Tableau 2.2</b> Caractéristiques des différents lots utilisés pour cette études, étude de composition par la méthode de Van Soest and Wine,1967.....	112
<b>Tableau 2.3</b> Caractérisation des lots 2 et 3 par la méthode NREL de détermination des polysaccharides et lignine dans la biomasse (Sluiter et al. 2012).....	113
<b>Tableau 2.4</b> Hydrolysabilité des lots de CMD employés .....	113
<b>Tableau 2.5</b> Résultats du tamisage du lot 3 .....	116
<b>Tableau 2.6</b> Composition des grains « durs » broyés .....	117
<b>Tableau 2.7</b> Profil de vis employé pour l'étude préliminaire avec BC21 .....	118
<b>Tableau 2.8</b> Paramètres et valeurs fixés pour l'étude préliminaire.....	119
<b>Tableau 2.9</b> Conditions opératoires employés pour étudier l'impact de NaOH, KOH et Ca(OH) <sub>2</sub> sur l'efficacité du prétraitement .....	120
<b>Tableau 2.10</b> Composition des extrudats et bilans matière obtenus pour 100Kg de CMD sec introduit pour un prétraitement mené à 130°C et 150°C avec différents agents alcalins à concentration en OH-équivalente.....	121
<b>Tableau 2.11</b> Hydrolysabilité des extrudats après 48h obtenus en utilisant différentes bases à une concentration de R: 6.0% en g de NaOH équivalents pour 100 g de matière sèche et des températures de fourreau de 130°C et 150 .....	123
<b>Tableau 2.12</b> Conditions d'extrusion pour de l'impact du ratio NaOH/CDM sec à 150°C en température du prétraitement .....	125
<b>Tableau 2.13</b> Caractéristiques de l'extrudat obtenu en matière sèche, fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignine (L) et résultats pour le bilan matière obtenu avec 100Kg de matière sèche de coproduit de maïs doux introduit.....	126
<b>Tableau 2.14</b> Hydrolysabilité des extrudats obtenus par modification de la charge en soude à 150°C .....	127
<b>Tableau 2.15</b> Conditions opératoires pour la deuxième étude avec NaOH et H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , modification de la température de prétraitement .....	128

<b>Tableau 2.16</b> Caractéristiques de l'extrudat obtenu en matière sèche (MS), fibre insoluble (FI), cellulose (C), hémicelluloses (H) et lignine (L) et résultats pour le bilan matière obtenu avec 100Kg de matière sèche de coproduit de maïs doux introduit .....	129
<b>Tableau 2.17</b> Hydrolysabilité des extrudats obtenus par modification de la température de fourreau des modules de prétraitement.....	130
<b>Tableau 2.18</b> Profil de vis employé sur EV25 pour l'étude de l'impact de la température et de la charge en alcalin en employant KOH .....	133
<b>Tableau 2.19</b> Conditions de prétraitement alcalin et neutralisation pour étude avec KOH .....	135
<b>Tableau 2.20</b> Données normalisées du plan d'expérience KOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	137
<b>Tableau 2.21</b> Conditions opératoires pour étude de l'influence de la concentration en KOH et la température de fourreau .....	137
<b>Tableau 2.22</b> composition des extrudats, des indicateurs des bilans massiques pour l'extrudat et caractéristiques du filtrat obtenus pour les essais réalisés avec KOH et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en modifiant le ratio R exprimé en g de NaOH pour 100 de CMD sec équivalent et T, la température de fourreau mesuré	138
<b>Tableau 2.23</b> Analyse statistique de l'effet des paramètres et T sur la composition des extrudat et les indicateurs de bilan de masse .....	139
<b>Tableau 2.24</b> Hydrolysabilité des extrudats exprimée en taux de glucose libéré (GL), xylose libéré (XL) et sucres libérés (SL) après 24h et 48h d'hydrolyse enzymatique .....	144
<b>Tableau 2.25</b> Hydrolysabilité des extrudats exprimée en rendement de glucose (RG), xylose (RX) et sucres (RS) après 24h et 48h d'hydrolyse enzymatique.....	144
<b>Tableau 2.26</b> Analyse statistique de l'effet des paramètres KOH/CMD <sub>sec</sub> et T sur les rendements en glucose (RG), xylose (RX) et en sucres (RS) obtenus après 48h d'hydrolyse enzymatique .....	148
<b>Tableau 2.27</b> Profil de vis détaillé employé pour essais de pour l'étude de l'influence de la température et du ratio NaOH/CMD sec sur du coproduit de maïs doux.....	154
<b>Tableau 2.28</b> Conditions de prétraitement des essais d'optimisation avec NaOH.....	156
<b>Tableau 2.29</b> Raw sweet corn characteristics: solid content, composition and enzymatic hydrolysis results .....	163
<b>Tableau 2.30</b> Extrudate composition, mass balance indicators and filtrate mineral matter for all samples analyzed .....	164
<b>Tableau 2.31</b> Statistical analysis of the effects of studied parameters on extrudate composition and mass balance indicators .....	165
<b>Tableau 2.32</b> Statistical analysis of the effect of the normalized parameters (temperature and NaOH/SCC) on extrudate and filtrate mineral matter .....	169
<b>Tableau 2.33</b> Enzymatic hydrolysis indicators. Results are based on glucose and xylose released after 48h, and express the enzymatic performances to digest extrudate (GR and XR) and yield of the overall process (GY and XY).....	170
<b>Tableau 2.34</b> Statistical analysis of the effect of studied parameters on enzymatic hydrolysis .....	171
<b>Tableau 2.35</b> Composition et indicateurs du bilan massique pour les extrudats et caractéristiques des filtrats obtenus para traitement avec NaOH et KOH du lot de CMD 2 .....	176
<b>Tableau 2.36</b> Coût relié aux produits chimiques pour la production d'un an à l'échelle semi-industrielle réalisée par la société MAGUIN .....	178
<b>Tableau 2.37</b> Profil de vis détaillé employé sur l'essai réalisé à échelle pilote du prétraitement alcalin .....	180
<b>Tableau 2.38</b> Conditions opératoires à échelle pilote et laboratoire du prétraitement alcalin.....	181
<b>Tableau 2.39</b> Caractéristiques des extrudeurs EV25 (échelle laboratoire) et EV53 (pilote) .....	182
<b>Tableau 2.40</b> Composition de la matière brute et des extrudats obtenus à l'échelle pilote et laboratoire .....	183
<b>Tableau 2.41</b> Comparaison des bilans des produits et des charges de BABET REAL 5 et BABETHANOL dans le cas du coproduit de maïs doux .....	186

<b>Tableau 3.1</b> Composition des extrudats obtenus de différentes expériences de bioextrusion en employant le lot de CMD 2.....	200
<b>Tableau 3.2</b> Composition des extrudats obtenus de différentes expériences de bioextrusion en employant le lot de CMD 3.....	200
<b>Tableau 3.3</b> Conditions d'extrusion et bioextrusion lors de la modification du ratio L/S enz.....	201
<b>Tableau 3.4</b> Composition et indicateurs des bilans massiques des bioextrudats lors de la modification du ratio L/S enz en employant le lot de matière CMD 3 .....	203
<b>Tableau 3.5</b> Conditions d'extrusion et bioextrusion des expériences de modification de la charge enzymatique avec le lot de CMD 3.....	204
<b>Tableau 3.6</b> Composition et indicateurs des bilans massiques des bioextrudats obtenus par modifications de la charge enzymatique à un ratio L/S enz de 2.3 avec le lot de CMD 3 .....	205
<b>Tableau 3.7</b> Conditions d'extrusion et de bioextrusion utilisées pour étudier l'impact du ratio L/S enz en bioextrusion sur la saccharification avec le CMD 3 .....	208
<b>Tableau 3.8</b> Conditions d'extrusion et bioextrusion lors de la modification de la charge en xylanase en employant le lot de CMD 3.....	210
<b>Tableau 3.9</b> Conditions d'extrusion et bioextrusion lors de la modification de la charge en xylanase en employant le lot de CMD 2 en employant le mélange Cellic Ctec 2 (90%) et NS22002 (10%) .....	215
<b>Tableau 3.10</b> Composition du coproduit de maïs doux non traité, de l'extrudat et du bioextrudat (conditions proches) correspondant au lot 2 et lot 3.....	216
<b>Tableau 3.11</b> Conditions de prétraitement et bioextrusion pour essai de saccharification dans le réacteur de 22L en employant le CMD 3.....	221
<b>Tableau 3.12</b> Conditions de prétraitement et bioextrusion pour essai 1 de saccharification et fermentation dans le réacteur de 22L.....	224
<b>Tableau 3.13</b> Conditions de prétraitement et bioextrusion pour essai 2 de saccharification et fermentation dans le réacteur de 22L.....	228
<b>Tableau 3.14</b> Conditions de bioextrusion et de saccharification-fermentation de l'essai 1 et 2 avec les résultats finaux obtenus.....	230
<b>Tableau 3.15</b> Composition du grain dur et des résidus contenus dans les moûts de fermentation des essais A et C, déterminés par ADF-NDF-KMNO <sub>3</sub> .....	231
<b>Tableau 3.16</b> Evaluation techno-économique de la production de bioéthanol à parti de coproduit de maïs doux réalisée par MAGUIN .....	235
<b>Tableau 4.1</b> Caractéristiques des extrudeurs.....	241
<b>Tableau 4.2</b> Caractéristiques des cocktails employés.....	243





## Résumé

Le bioéthanol lignocellulosique est potentiellement une source durable de remplacement des combustibles fossiles. Cependant, pour atteindre une phase de commercialisation de cette technologie, des barrières techniques doivent être franchies au niveau de chaque étape de production : prétraitement, saccharification, fermentation et distillation. Un procédé de déconstruction de la biomasse comportant les étapes de prétraitement alcalin, neutralisation, filtration et imprégnation enzymatique dans un extrudeur bi-vis a été développé lors du projet BABETHANOL (2010-2013). L'optimisation de ce procédé est entreprise dans cette étude en utilisant comme matière végétale modèle, le coproduit de maïs doux (CMD). La première partie de cette étude traite sur la diminution du coût relié à l'emploi de produits chimiques lors des étapes de prétraitement alcalin et de neutralisation. Pour cela, plusieurs stratégies ont été étudiées : la modification de l'agent alcalin employé lors de l'étape de prétraitement (NaOH, KOH et Ca(OH)<sub>2</sub>) et la modification de la température et la concentration en alcalin lors des étapes de prétraitement. Les résultats obtenus montrent la possibilité de diminuer la charge en alcalin avec une augmentation de la température de prétraitement. L'optimisation du prétraitement alcalin a ainsi permis une diminution de la charge en soude et acide employés, ce qui s'est traduit par une diminution de 5 millions d'euros des coûts opératoires annuels du procédé. La deuxième partie de cette étude aborde l'optimisation des étapes d'imprégnation enzymatique en extrudeur bi-vis et d'hydrolyse enzymatique consécutives en réacteur. Premièrement, l'étude s'est focalisée sur l'étude de l'impact de la modification du ratio liquide/solide et de la charge enzymatique appliquées lors de cette étape de bioextrusion. Par la suite, l'implémentation des étapes consécutives de prétraitement – imprégnation enzymatique-saccharification/fermentation consécutives est traitée. De ce fait, une série d'essais ont été menés en couplant l'extrudeur bi-vis à un réacteur de 22L où la saccharification ou/et la fermentation ont été poursuivies. Au bilan, ces travaux présentent un procédé en continue adaptable à grande échelle, et avec un rendement à échelle laboratoire de 12,7 Kg d'éthanol pour 100Kg de coproduit de maïs doux sec.

## Summary

Lignocellulosic bioethanol is a sustainable alternative to replace fossil fuels. However, technical barriers at each operational step (pretreatment, saccharification, fermentation and distillation) are part of the bottlenecks for its commercialization. A process counting with an alkaline pretreatment, neutralization, filtration and enzymatic impregnation within a twin screw extruder was set up during BABETHANOL project (2010-2013). The optimization of the process was undertaken in the present study with Sweet Corn Coproduct (SCC) as model raw biomass. In the first part of the study, the conditions of the alkaline pretreatment were evaluated in order to diminish the chemical load, thus reducing their economic cost. For this matter, different strategies were employed: the modification of the chemical agent (NaOH, KOH and Ca(OH)<sub>2</sub>), the temperature and alkali load of the pretreatment. The results indicate that sodium hydroxide exhibits a higher efficiency and a lower cost than potassium hydroxide and calcium hydroxide. An increase of temperature can balance the reduction of chemical input, thus diminishing annual operating costs of the process by 5 million euros. In the second part of the study, the research focuses on the optimal conditions of enzymatic impregnation, also called bioextrusion. Firstly the study the impact of the liquid/solid ratio and the enzymatic load apply during bioextrusion on saccharification at high consistency was carried out. Furthermore, the evaluation of the conditions of the implementation of the consecutive pretreatment- bioextrusion-saccharification/fermentation was performed. For this matter, a series of essays were executed with the whole process set up at lab-scale, i.e. extruder coupled with a 22L reactor. At the outcome, the research work presents a continuous process with the possibility of scale-up that presents a yield of 12.7Kg of ethanol with 100Kg of dry sweet corn coproduct.