



HAL
open science

**Etude du comportement d'une levure OGM
co-consommant les pentoses et les hexoses en condition
de culture à très haute matière sèche : application
bioéthanol**

Arnaud Fougerouse

► **To cite this version:**

Arnaud Fougerouse. Etude du comportement d'une levure OGM co-consommant les pentoses et les hexoses en condition de culture à très haute matière sèche : application bioéthanol. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2021. Français. NNT : 2021ISAT0053 . tel-04758916

HAL Id: tel-04758916

<https://theses.hal.science/tel-04758916v1>

Submitted on 29 Oct 2024

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.



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**
Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse

**Présentée et soutenue par
Arnaud FOUGEROUSE**

Le 30 juin 2021

**Etude du comportement d'une levure OGM co-consommant les
pentoses et les hexoses en condition de culture à très haute
matière sèche : application bioéthanol**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche :

TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par

Stéphane GUILLOUET et Xavier CAMELEYRE

Jury

M. Pierre FONTANILLE, Rapporteur

Mme Harivony RAKOTOARIVONINA, Rapporteur

M. Thierry RIBEIRO, Rapporteur

Mme Caroline REMOND, Examinatrice

Mme Catherine SARAZIN, Examinatrice

M. Stéphane GUILLOUET, Directeur de thèse

“If you are going through hell, keep going.”

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Xavier Cameleyre pour m'avoir donné une chance en tant qu'ingénieur puis en tant que doctorant et avoir cru en mes capacités. Merci pour ces 5 ans au sein de l'EAD8 qui furent riches en enseignement.

Je remercie aussi toute l'équipe de l'EAD8, Stéphane, Carine, Natalie, Sandrine, Julie pour tous ces moments passé ensemble et tous le savoir transmis. Sans oublier Éric sans qui bon nombre d'expériences n'aurait pu aboutir.

Bien sur la fine équipe sportive : Lucie, Elodie et Florence, pour les kilomètres parcourus, à la course à pieds comme à la nage. Yannick pour le coaching, Yassim, mon partenaire de triathlon et de soirées alcoolisées.

Je n'oublie pas Pablo mon prédécesseur ibérique et son flegme légendaire, Alexander pour les corrections de la publication. Tous les doctorants ou stagiaires avec qui j'ai passé de bon moments, ils se reconnaîtront.

Merci aussi à tous les partenaires du projet Babet Real, nos réunions internationales auront rythmé avec plaisir ces années, et m'auront permis d'assouvir mes envies de voyage.

Je tiens finalement à remercier Marion ma compagne qui m'a supporté et soutenu tout au long de ce parcours du combattant.

Merci aussi à mes amis, ma famille, et plus spécifiquement mes parents, qui se demandent quand finiront enfin mes études.

Je tiens également à remercier les correcteurs de ce manuscrit et les membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail et pour leurs conseils avisés.

Sommaire

1. INTRODUCTION	17
2. ETAT DE L'ART	21
2.1. Biocarburants	23
2.1.1. BIOCABURANTS DE PREMIERE GENERATION.....	25
2.1.1.1. Première génération et développement durable	29
2.1.2. BIOCABURANTS DE 2EME GENERATION	30
2.2. Bioéthanol.....	31
2.2.1. PREMIERE GENERATION	32
2.2.2. DEUXIEME GENERATION.....	33
2.3. Biomasse lignocellulosique	33
2.3.1. La cellulose.....	35
2.3.2. Les hémicelluloses	36
2.3.2.1. Galactoglucomannanes (GGMs)	36
2.3.2.2. Glucuronoxylans (GX).....	37
2.3.2.3. Arabinoglucuronoxylans (AGXs).....	37
2.3.2.4. Xyloglucans (XGs).....	37
2.3.2.5. Arabinoxylans (AXs).....	38
2.3.3. Lignine.....	38
2.4. Prétraitement	39
2.4.1. Traitement acide	40
2.4.2. Acide concentré.....	40
2.4.3. Acide dilué.....	40
2.4.4. Traitement alcalin	41
2.4.5. Explosion à la vapeur	42
2.4.6. Prétraitement des fibres à l'ammoniaque (AFEX).....	43
2.4.7. Organosolv	43
2.4.8. Traitement thermo-mécano-chimique en extrudeur bivis ..	44
2.5. Hydrolyse enzymatique	48
2.5.1. Enzymes et mécanismes d'action	48
2.5.1.1. Cellulases	49
2.5.1.2. Hémicellulases.....	50

2.6. Facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique	52
2.6.1. Hydrolyse enzymatique à haute consistance	54
2.7. Procédé.....	55
2.7.1. Separate hydrolysis and fermentation (SHF).....	56
2.7.2. Simultaneous sacharification and fermentation (SSF)	57
2.7.3. Simultaneous sacharification and Co-fermentation (SSCF) 57	
2.7.4. Pré hydrolysis and Simultaneous sacharification and Co-fermentation (PH-SSCF)	57
2.7.5. Preselective sacharification and fermentation.....	58
2.7.6. Direct microbial conversion/consolidated bioprocessing ...	59
2.7.7. Fed batch.....	60
2.8. Microorganisme	61
2.8.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
2.8.1.1. <i>Cycle biologique</i>	64
2.8.1.2. <i>Métabolisme sucres et production éthanol</i>	66
2.8.1.3. <i>Facteurs influençant le rendement</i>	68
2.8.1.3.1. <i>Température</i>	68
2.8.1.3.2. <i>PH</i>	69
2.8.1.3.3. <i>Variations de salinité et d'osmolarité</i>	69
2.8.1.3.4. <i>Présence d'inhibiteurs de la fermentation</i>	70
2.8.1.3.5. <i>Consommations des pentoses, modification génétique</i>	71
2.8.1.3.6. <i>Voie oxydo-reductase, Co facteurs dépendante (XR/XDH)</i> ..	73
2.8.1.3.7. <i>Voie métabolique cofacteur indépendante (XI)</i>	75
3. MATERIELS ET METHODES.....	77
3.1. Matériel.....	78
3.1.1. Coproduit de maïs doux/ Sweet corn cob (SCC)	78
3.1.2. Extrudeur bi-vis	78
3.1.3. Cocktails enzymatiques	81
3.1.4. Souches et milieux de fermentation.....	81
3.1.4.1. <i>Souches utilisées</i>	81
3.1.4.2. <i>Compositions des milieux</i>	82
3.1.4.2.1. <i>Milieux de remises en cultures</i>	82
3.1.4.2.2. <i>Milieu Minimum</i>	82
3.1.4.3. <i>Préparation de l'inoculum</i>	84
3.1.5. Bioréacteurs.....	85
3.1.6. Pilote	87
3.2. Méthodes	89
3.2.1. Composition en cellulose, hémicelluloses et lignines.....	89

3.2.2. Hydrolyses enzymatiques.....	91
3.2.3. SSCF en bioréacteurs 5L Sartorius.....	92
3.2.4. SSCF réalisée dans le réacteur de 22L Solaris.....	92
3.2.5. SSCF à l'échelle pilote	92
3.2.6. Mesure de la concentration de la biomasse	92
3.2.7. Analyse chromatographique	93
3.2.8. Analyse statistique.....	93
4. PROCEDE BABET REAL.....	95
4.1. Biomasses.....	98
4.2. Prétraitement	100
4.3. Hydrolyse enzymatique	103
4.4. Fermentation	104
5. COMPREHENSION DES MECANISMES LIMITANT LES PERFORMANCES ET OPTIMISATION DU PROCEDE	106
5.1. Effet du prétraitement.....	108
5.1.1. Ajout d'une phase de filtration	108
5.1.2. Impact du taux de matières sèches	111
5.1.3. Lavage des extrudâts	117
5.2. Effet des sels sur le microorganisme.....	122
5.2.1. Expériences en flacon scellé	122
5.2.2. Chemostat.....	124
5.3. Impact de la conduite du procédé sur la consommation du xylose et la production d'éthanol	130
5.3.1. Fedbatch	130
5.3.2. Impact de l'hydrolyse sur la consommation du xylose et la production d'éthanol.....	137
5.3.2.1. PH-SSCF versus SSCF	137
5.3.2.2. Pré-Hydrolyse sélective	146
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	148
7. AMELIORATION SPECIFIQUE DU PROCEDE BABET REAL5	155
7.1. COUPLAGE EXTRUSION	156
7.2. Echelle pilote, mise au niveau TRL5.....	163
8. BIBLIOGRAPHIE.....	168
9. ANNEXES.....	181

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM SWEET CORN COPRODUCT BY A CONTINUOUS PRETREATMENT INVOLVING BIOEXTRUSION AND SUBSEQUENT SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND CO-FERMENTATION	183
KEYWORDS:	183
ABSTRACT:	183
1. INTRODUCTION	184
2. MATERIALS AND METHODS	186
2.1 Materials	186
2.2 Twin screw extruder.....	186
2.3 Alkaline thermo-mechano-chemical pre-treatment and neutralization phase.....	187
2.4 Bioextrusion.....	188
2.5 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) 188	
2.5.1 Pilot scale reactor	188
2.5.2 Lab scale reactor.....	188
2.5.3 Yeast strain.....	188
2.5.4 Precultures.....	189
2.5.5 SSCF in pilot scale reactor.....	189
2.6 Analytical methods.....	189
2.6.1 Dry matter and parietal compounds	189
2.6.2 Total sugar analysis	190
2.6.3 Sample analysis.....	190
3. RESULTS AND DISCUSSION	190
3.1 Characterization of raw and pretreated biomass.....	190
3.2 Hydrolysis	191
3.3 Saccharification and fermentation in bioreactor.....	191
4. CONCLUSION	196
5. ACKNOWLEDGEMENTS	196
6. REFERENCES.....	196
7. FIGURE CAPTIONS.....	207
8. TABLES AND FIGURES.....	208
QUANTIFICATION OF YEASTS IN LIGNOCELLULOSIC FERMENTATION PROCESSES BY QRT PCR METHOD.	214

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des espèces de levure capable de produire de l'éthanol.....	62
Tableau 2. Liste des bactéries capables de produire de l'éthanol et leur rendement.....	63
Tableau 3. Caractéristiques principales des extrudeurs CLEXTRAL employés dans cette thèse.....	79
Tableau 4. Caractéristiques des cocktails enzymatiques utilisés dans cette étude. Données LCA	81
Tableau 5. Composition du milieu YEPX.....	82
Tableau 6. Composition du milieu minimum.....	83
Tableau 7. Solution d'oligoéléments	83
Tableau 8. Solution de vitamines	84
Tableau 9. Compositions de différentes solutions utilisées	90
Tableau 10. Caractéristiques des différentes biomasses lignocellulosique utilisées.....	99
Tableau 11. Résultats obtenus avec les différentes biomasses testées.	99
Tableau 12. Conditions et résultats des tests menés en SSCF avec du SCC prétraité en utilisant différentes concentrations de cocktail enzymatique Cellic Ctec2.....	104
Tableau 13. Résultats de SSCF d'extrudât et bioextrudat prétraité avec ou sans filtration	110
Tableau 14. Résultats expérimentaux de SSCF de SCC à différents taux de matières sèches.....	114
Tableau 15. Résultat d'expériences en SHF de SCC prétraité lavé ou non, à différentes concentration en matière sèches.....	120
Tableau 16. Résultats d'expériences en SHF de SCC prétraité lavé, à différentes concentration en matière sèches.....	121
Tableau 17. Résultats obtenus par fermentation en flacons scellés de SCC pré-hydrolysé (48h) en présence de différents sels à différentes concentrations.	123
Tableau 18. Paramètres du chemostat lors des régimes permanents selon le milieu utilisé.....	125
Tableau 19. Résultats des expériences en Fed Batch à partir de SCC prétraité.....	136
Tableau 20. Résultats comparatif du procédé en SSCF ou en PH-SSCF (pré-hydrolyse de 24h).....	139
Tableau 21. Comparatif des deux lots de SCC utilisés, pourcentage de cellulose (m/m) et d'Hémicellulose et leurs rendements d'hydrolyse respectifs.....	140
Tableau 22. Résultats comparatif du procédé en SSF ou en PH-SSCF (préhydrolyse de 24h ou de 48h)	143
Tableau 23. Résultats comparatif des expériences de couplage et de fermentation en laboratoire des mêmes bioextrudat.	160

Tableau 24. Résultats des différentes expériences de couplage extrusion/fermentation	162
Tableau 25. Résultats des expériences de couplage extrusion/fermentation à l'échelle pilote.....	167

Table des illustrations

Figure 1. Evolution de la température moyenne planétaire relativement à la période 1850 - 1900. (WMO Statement on the State of the Global Climate in 2019).....	22
Figure 2. Parts des émissions de gaz à effet de serres par secteur en Europe en 2017. (https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/transport-emissions-of-greenhouse-gases/transport-emissions-of-greenhouse-gases-12).....	23
Figure 3. Evolution de la production de biocarburants liquides dans l'union Européenne 1900-2017	25
Figure 4. Production de FAME (Y. Zhang et al., 2003)	26
Figure 5. Filières classiques de biocarburants.....	27
Figure 6. Classement des pays producteurs de biocarburants et leurs principales sources.	28
Figure 7. Prédiction de la production (a.) et de la consommation (b.) de bioéthanol à l'échelle mondiale d'ici 2024. (OCDE 2015) (Bušić et al., 2018)	29
Figure 8. Futur des biocarburants	31
Figure 9. liste de de différentes biomasse utilisées pour produire du bioéthanol et leurs avantages.....	32
Figure 10. Structure de la lignocellulose et de ces bio polymères : cellulose, hémicelluloses et lignine (Hernández-Beltrán et al., 2019).....	34
Figure 11 Représentation schématique de la structure générale de la paroi secondaire des végétaux. Les micro fibrilles de cellulose composée de chaînes de glucane sont représentées en jaune. Les hémicellulose sont représenté en bleu, ces hémicelluloses se lient à la surface des micro fibrilles par des liaisons hydrogène. Enfin en marron est représenté le réseau de lignine, celui-ci enrobe et pénètre dans le réseau cellulose – hémicellulose. (Marriott et al., 2016).....	34
Figure 12. Molécule de cellobiose	35
Figure 13. (a). Structure moléculaire de la cellulose, les molécules de glucose adopte alternativement une rotation de 180° (b). Microfibrille de cellulose comportant des parties cristalline et amorphes qui s'agrègent en microfibrille (Gibson, 2012).....	35
Figure 14 Hémicelluloses et leurs monomères principaux présent dans les différents types de végétaux.. AG :Arabinogalactane ; GGM : Galactoglucomannane. GM :Glucomannane ; AGX : Arabinoglucuronoxylane ; GX : Glucuronoxylane ; XG :	

Xyloglucane ; GAX :Glucuronoarabioxylane ; AX : Arabinoxylan.(Gírio et al., 2010)	38
Figure 15 a) Les Monolignols M : monomères ligneux primaire b) Polymère de lignine P annoté selon la substituions methoxye sur l'anneau aromatique c) unités structurelle majoritaire dans le polymère (Ralph et al., 2004).....	39
Figure 16 Complexe lignine-polysaccharide (LCC) de la paroi végétale de maïs et transformation par un agent alcalin (Buranov & Mazza, 2008).....	42
Figure 17. Schéma d'un extrudeur Bi-vis.....	45
Figure 18. schéma des différents types de vis.....	46
Figure 19. Vue schématique de la dégradation de la cellulose. Les endoglucanases hydrolisent les liaisons de la cellulase en interne, les cellobiohydrolases clivent les unités de cellobiose à l'extrémité des chaines polysaccharidiques. Finalement les unités de cellobiose libérées sont hydrolysées par les β -Glucosidases en glucose.	50
Figure 20. Vue schématique de la dégradation des hémicelluloses. (de Souza, 2013)	52
Figure 21 Interférences induites par la présence de lignine. En limitant l'accès au cellulase par encombrement stérique (rouge), la lignine (jaune) va induire une diminution des performances. Les lignines peuvent aussi attirer et adsorber les cellulases, diminuant ainsi leurs concentrations « actives ». Enfin on peut aussi observer une inhibition spécifique par de petites molécules issues de la déconstruction des lignines (acide vanillique, vanillin, pyrocatechol, acide ferullique et caféique... (Donohoe & Resch, 2015)	54
Figure 22. Utilisation de bioréacteurs dans les différents procédés existant actuellement (Toor et al., 2020)	56
Figure 23. Schéma récapitulatif des différents procédés et de leurs étapes.(Parisutham et al., 2014).....	60
Figure 24. <i>S. cerevisiae</i> vue au microscope à contraste de phase.....	64
Figure 25. Cycle de vie de <i>S. Cerevisiae</i> (Sun & Heitman, 2011).....	65
Figure 26. Respiration cellulaire chez <i>S. Cerevisiae</i> (Faria-Oliveira et al., 2013)	66
Figure 27. Fermentation Alcoolique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
Figure 28. Biosynthèse du glycérol (Aslankoohi et al., 2015).....	68
Figure 29. Les principaux transporteurs de cations, transmembranaire et intracellulaire chez la levure <i>S. cerevisiae</i> (Ariño et al., 2010).....	69
Figure 30. Formation des inhibiteurs lignocellulosiques (Jönsson et al., 2013).....	70
Figure 31. Vue schématique des mécanismes d'inhibition des furans, acides faibles et phénols.(Almeida et al., 2007).....	71
Figure 32. Conversion du xylose en éthanol via des voies métabolique dépendante(III) ou indépendante de cofacteurs (I-II) (Kuyper et al., 2003).....	72
Figure 33. La voie métabolique oxydo-reductrice (Karhumaa et al., 2007)	74
Figure 34. La voie métabolique Xylose Isomérase (XI) (Karhumaa et al., 2007).....	76
Figure 35. Extruder Ev25 et Ev53	79

Figure 36. Exemple de configuration et profil de vis utilisé pour le pré-traitement de coproduit de maïs doux sur l'EVOLUM 25 (TP : Sondes de température).....	80
Figure 37. Chaîne d'inoculation utilisée pour les manipulations en bioréacteur 5L	85
Figure 38. Photographie du matériel utilisé lors des expériences de Fedbatch	86
Figure 39. Bioréacteur couplé à l'extrudeur Clextral EV25.....	87
Figure 40. Vis sans fin de convoyage et bioréacteur de 300 litres pour les expériences à l'échelle pilote.	88
Figure 41. Couplage extruder baxis et bioréacteur à l'échelle pilote.....	89
Figure 42. Echelle TRL permettant d'évaluer le niveau de maturité d'une technologie. 97	
Figure 43. Schéma récapitulatif du procédé développé par BABETREAL5	98
Figure 44. Structure d'un plant de maïs.....	100
Figure 45. Schéma récapitulatif du prétraitement par extrusion bi vis du projet BABETREAL-5	101
Figure 46. Performances du NaOH comparé au KOH sur le rendement d'hydrolyses du glucose et du xylose. Pré-traitement à 150°C, solution alcaline à 3.75% (w/w). Données produite par INPT et UNAM.....	102
Figure 47. Graphique représentant la production d'éthanol en g/L au cours du temps en SSCF avec du SCC prétraité en utilisant différentes concentrations de cocktail enzymatique Cellic Ctec2	103
Figure 48. Diminution de la matière minérale en g/g biomasse après l'ajout d'une étape de filtration dans la filière d'extrusion	108
Figure 49. Résultats de l'hydrolyse enzymatique (INPT).....	109
Figure 50. Résultats de SSCF avec du bioextrudat SCC prétraité sans filtration 22% de matières sèche.	109
Figure 51. Résultats de SSCF avec du bioextrudat SCC prétraité avec filtration, 23% de matières sèche.	110
Figure 52. Comparaison des rendements d'hydrolyses à 120h de SCC à différents taux de matières sèches.	112
Figure 53. Concentration résiduelle d'éthanol au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèches (20%, 25%, 29%)	113
Figure 54. Concentration résiduelle de glucose au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèches (20%, 25%, 29%)	113
Figure 55. Concentration résiduelle de xylose au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèches (20%, 25%, 29%)	114
Figure 56. Concentration résiduelle de glycérol au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèches (20%, 25%, 29%)	116
Figure 57. Concentration de sel de sulfate et de sodium dans les extrudats de Sweet Corn Cob prétraité à différents taux de matière sèches.....	117

Figure 58. Comparaison des concentration de sel de sulfate et de sodium dans les extrudats de Sweet Corn Cob prétraité et lavé ou non à différents taux de matière sèches.....	117
Figure 59. Rendement d'hydrolyse à 120h pour le glucose et xylose à partir de SCC prétraité, lavé ou non. A différents taux de matières sèches (20%, 25%, 30%). Comparatif entre extrudât lavé ou non.	118
Figure 60. Production d'éthanol par CelluX 4 en SHF à partir SCC prétraité et lavé ou non à différents taux de matières sèches.....	119
Figure 61. Consommation du Xylose par CelluX 4 en SHF à partir SCC prétraité et lavé ou non à différents taux de matières sèches	119
Figure 62. Consommation du glucose par CelluX 4 en SHF à partir SCC prétraité et lavé ou non à différents taux de matières sèches	120
Figure 63. Ethanol produit en g/L, estimé par perte de poids, expériences en flacons scellés SHF de SCC à 20% en présence ou non de différents sels.....	123
Figure 64. Consommation en pourcentage du xylose ajoutée lors d'un ajout dosé de xylose 2g/l (100% = 2g/l).....	126
Figure 65. Vitesse de consommation du xylose selon le milieu utilisé lors d'un pulse de 2g/L de xylose.....	127
Figure 66. Consommation en pourcentage du xylose ajoutée lors d'un ajout dosé de 2g/l de xylose et 2g/l de glucose (100% = 2g/l).....	128
Figure 67. Vitesse de consommation du xylose selon le milieu utilisé lors d'un pulse de 2g/L de xylose et de 2g/L de glucose.	129
Figure 68. Photographie de l'équipement utilisé pour les expériences en Fed Batch....	131
Figure 69. Plan rapproché de l'équipement utilisé pour les expériences en Fed Batch. Un feeder posé sur une balance est utilisé pour mesurer les quantités d'extrudat qui sont envoyées dans l'extrudeur. Ce substrat passe ensuite dans un force feeder à vis qui permet de remplir efficacement l'extrudeur bi-vis pour avoir un apport de matière continu.	131
Figure 70. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.....	132
Figure 71. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.....	133
Figure 72. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.....	134
Figure 73. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.....	135

Figure 74. Evolution du rendement d'hydrolyse (%) du Glucose et du xylose au cours du temps. 50ml de moût en Erlen Meyer. Bioextrudat de SCC à 5%, température 45°C, Cellic Ctec2 15FPU/g et NS20022 10% (v/v) du volume de Ctec2.....	137
Figure 75. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences avec pré-hydrolyse de 24h suivi de SSCF à partir de SCC à 20%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation.	138
Figure 76. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences de SSCF à partir de SCC à 20%	139
Figure 77. Comparaisons de l'aspect visuel des différents lots de maïs doux utilisé. Lot 2016 à Gauche, Lot 2017 à Droite.	141
Figure 78. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences de SSCF à partir de SCC à 22%	141
Figure 79. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences en Pré-hydrolyse de 24h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de SCC à 22%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation	142
Figure 80. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences de pré-hydrolyse de 48h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de SCC à 25%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation.	142
Figure 81. Concentrations du glucose, xylose, éthanol et glycérol lors d'expériences de SSCF à partir de BS à 25%.....	144
Figure 82. Concentrations du glucose, xylose, éthanol et glycérol lors d'expériences de pré-hydrolyse de 24h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de BS à 25%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation	144
Figure 83. Concentrations du glucose, xylose, éthanol et glycérol lors d'expériences de pré-hydrolyse sélective de 24h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de SCC à 25%.	146
Figure 84. Schéma récapitulatif du couplage extrusion/fermentation.....	156
Figure 85. Photographie du dispositif en place au LCA	156
Figure 86. Concentrations de glucose, xylose, éthanol et glycérol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 27.2% en conduite SSCF.	157
Figure 87. Concentrations de glucose, xylose, éthanol et glycérol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 25% en conduite SSCF lors d'un coulage extrudeur, bioréacteur.....	158
Figure 88. Concentrations de glucose, xylose, éthanol et glycérol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 25% en conduite SSCF. Substrat similaire à l'expérience précédente mais fermentation en bioréacteur de 5L dans nos locaux..	158
Figure 89. Concentrations de glucose, xylose et éthanol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC a 19% en conduite SSCF.....	159
Figure 90. Concentrations de glucose, xylose et éthanol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 20% en conduite SSCF. Substrat similaire à l'expérience précédente mais fermentation en bioréacteur de 5L dans nos locaux.....	160

Figure 91. Concentrations de glucose, xylose et éthanol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC a 19.5% en conduite SSCF.....	161
Figure 92. Photographie du matériel utilisé à l'échelle pilote	164
Figure 93. Comparaison des paramètres mis en œuvre à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote rapporté à 100 Kg de biomasse traitée	165
Figure 94. Rendement d'hydrolyse en pourcentage. Comparaison entre le substrat prétraité à l'échelle laboratoire (Ctec2 10FPU/g) et celui prétraité à l'échelle pilote (Ctec2 15FPU/g).....	166
Figure 95. Schematic representation of twin-screw extruder EV25, formed by 10 thermoregulated modules. The temperature set point is indicated for each module. NC: Non-Controlled; TP: Temperature Probe.....	207
Figure 96. Hydrolysis yields for glucose and xylose of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g.	207
Figure 97. Kinetics of the consumption of glucose, xylose and the production of ethanol during the simultaneous saccharification and cofermentation of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g with citrate buffer.....	207
Figure 98. Kinetics of the consumption of glucose, xylose and the production of ethanol during the simultaneous saccharification and cofermentation of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g without buffering.....	207
Figure 99. Kinetics of the consumption of glucose, xylose and the production of ethanol during the co-fermentation of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g without buffering. A. SCC at 20% B. SCC at 25% C. SCC at 29%	207
Figure 100. Evolution of the residual concentration of Ethanol (A) and xylose (B) during fermentation of bioextruded SCC at 20%, 25% and 29%	207

Nom : FOUGEROUSE

Prénom : Arnaud

Titre : « Etude du comportement d'une levure OGM Co-consommant les pentoses et les hexoses en condition de culture à très haute matière sèche : application bioéthanol

»

Année : 2021

Lieu : INSA Toulouse

Résumé :

Ces travaux visent à améliorer le procédé de production de bioéthanol de seconde génération développé dans le cadre du projet européen BABET REAL5. Ce procédé se propose d'effectuer toutes les étapes de la production de bioéthanol de seconde génération de façon compacte avec un minimum d'installation, en couplant un prétraitement de la biomasse lignocellulosique par extrusion bi-vis à un bioréacteur dans lequel se déroulent la saccharification et la fermentation de façon simultanée.

Nos recherches ont permis de déterminer la conduite la plus adéquate, pour un substrat de référence composé de rafle de maïs. Cette conduite en SSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) permet d'atteindre de très bon résultats en rendement éthanol tout en maximisant les temps de séjour et la consommation du xylose. En premier lieu nous avons pu démontrer que le couplage des deux étapes était réalisable et fonctionnel à l'échelle laboratoire, puis nous avons pu tester cette conduite à une échelle pilote 10 fois plus grande.

Finalement dans une deuxième partie, nous nous sommes penchés sur un des principaux freins observés lors de nos expériences. L'analyse de certains de nos résultats nous a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des sels provenant du prétraitement dans l'inhibition de la consommation du xylose par notre microorganisme modèle, une levure *Saccharomyces Cerevisiae* modifiée génétiquement pour consommer le xylose. Ces travaux devront être complétés pour comprendre les mécanismes en œuvre d'un point de vue métabolique dans la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et pourquoi ces sels inhibent essentiellement la voie de consommation du xylose.

Mots-clés :

Haute Matière sèche, Biomasse Lignocellulosique, Bioéthanol, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation

Name: FOUGEROUSE

First name: Arnaud

Title: « Behavioral study of a pentoses and hexoses co-fermenting GMO yeast under high dry matter conditions : bioethanol application »

Year : 2021

Place: INSA Toulouse

Abstract:

The goal of this work is to improve the second-generation bioethanol production process developed by the BABETREAL Project.

This process aims to manage all the operations needed to produce 2G bioethanol in a compact way, using a bi-vis extruder coupled with a bioreactor for an efficient pretreatment, followed by direct saccharification and co-fermentation.

Our research helped determine the best conduct of the process using Sweet Corn cob as a model.

The SSCF conduct (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) allows us to reach very good ethanol yield while maximizing processing time and the consumption of xylose.

First, we were able to demonstrate that the coupling of both stages, namely extrusion and SSCF was feasible and functional at laboratory scale. We also managed to test this conduct at pilot scale, which is roughly ten times bigger than laboratory scale, without diminishing the performances.

Finally, in a second part, we studied the major obstacles met during the first part of this study. The analysis of some of our experiments, helped us highlight a major role of pretreatment salts in the inhibition of xylose consumption by a GMO *Saccharomyces Cerevisiae* Cellux 4.

This work needs to be completed to understand more precisely the mechanism in action from a metabolic point of view in the *Saccharomyces Cerevisiae* yeast. And specifically, why these salts seem to mainly inhibit the consumption path of xylose.

Key words:

High dry matter, Lignocellulosic biomass, Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentation

1.INTRODUCTION

Il apparaît aujourd'hui évident que la limitation de la consommation de carburants dérivés du pétrole va être un des enjeux majeurs des prochaines décennies. En effet, leur contribution directe au réchauffement climatique et à la pollution atmosphérique en fait un des leviers principaux dans la lutte contre les émissions des gaz à effet de serre. De plus, la hausse constante de leur utilisation, principalement dans les pays en voie de développement plaide en faveur du développement d'alternatives plus propres et moins carbonées dans des délais les plus courts possibles.

L'utilisation de carburants alternatifs comme le gaz, l'électricité, l'hydrogène semble être une des solutions, certains sont déjà commercialisés et d'autres encore à l'étude, mais leur adoption à grande échelle prendra beaucoup de temps. A l'inverse, la mise en place de biocarburants comme le bioéthanol est beaucoup plus simple, ne nécessitant pas un réseau de distribution indépendant et pas ou peu de modification des véhicules ou des moteurs. Leurs productions à partir de biomasse les rendent plus propres et permettent de réduire grandement les émissions de GES en comparaison avec les produits pétroliers.

Le bioéthanol utilisé actuellement à hauteur de 10% dans l'essence est produit par fermentation de sucres simples provenant de canne à sucre, betterave ou céréales. Qualifié de première génération, la critique principale de ce biocarburant est la concurrence avec les cultures alimentaires. Cette concurrence peut en effet accroître des problèmes d'accès à la nourriture dans certains pays, ainsi que favoriser la hausse des cours de certaines denrées alimentaires essentielles.

Une seconde génération a donc été développée en vue de pallier ce problème, l'utilisation de biomasse lignocellulosique permettrait l'utilisation de déchets agricoles pour la production de bioéthanol.

Pour cela, cette biomasse lignocellulosique a besoin d'un traitement permettant la séparation de ces constituants principaux, les rendant fermentables par des microorganismes classiques.

De nombreux systèmes de prétraitement existent actuellement, mais le projet Babet Real 5 se propose d'effectuer toutes les étapes de la production de bioéthanol de seconde génération de façon compacte avec un minimum d'installation.

En utilisant un extrudeur bi-vis couplé à un bioréacteur, nous sommes capables de procéder à un prétraitement de la biomasse lignocellulosique suivi d'une hydrolyse enzymatique puis d'une fermentation.

L'objectif de cette étude a été de définir la meilleure conduite de procédé permettant d'atteindre des performances optimales, tout en identifiant les limitations inhérentes à ce procédé.

Le chapitre II est constitué d'un état de l'art des connaissances actuelles sur le sujet. Cette revue bibliographique aborde la production de bioéthanol de seconde

génération en général et détaille les différents prétraitements actuellement disponibles ainsi que leurs forces et faiblesses. Les connaissances sur les autres étapes du procédé sont aussi détaillées : saccharification enzymatique et fermentation.

Le chapitre III présente le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude.

Le chapitre IV présente brièvement le projet Babet real et les conditions en vigueur au début de cette étude.

La chapitre V expose quant à lui les améliorations principales que nous avons pu développer à partir du procédé ainsi que les résultats obtenus en termes de gain de performances.

Le chapitre VI est la continuité du chapitre V et se penche plus précisément sur les obstacles rencontrés lors de notre étude, en essayant de les comprendre et de les résoudre. Compte tenu du temps imparti, toutes les réponses ne sont pas apportées, mais nous espérons avoir permis d'initier de futures recherches en ayant pu identifier certains freins majeurs lors de la phase de fermentation.

Finalement le chapitre VII développe une conclusion de nos travaux et permet de lancer une discussion en proposant des perspectives de recherche.

2. ETAT DE L'ART

Dans un monde connecté et globalisé, la dépendance de l'humanité à l'énergie est devenue une problématique majeure pour l'évolution de nos sociétés.

Il devient clair que la consommation abusive et massive d'énergies fossiles doit rapidement être endiguée et il est essentiel que d'autres solutions soient mises en place.

En effet, le changement climatique apparait comme une préoccupation majeure pour les années à venir, celui-ci touchant toutes les régions de la terre. Les phénomènes météorologiques extrêmes sont de plus en plus fréquents. Selon l'Organisation Météorologique Mondiale (OMM) Depuis 1980, chaque décennie a été plus chaude que celle d'avant. Loin de s'arrêter ce changement global s'accélère, les années 2015 à 2019 ayant été les cinq années les plus chaudes jamais enregistrées. Et l'année 2019 s'est terminée avec une température moyenne de $+1.1^{\circ}\text{C}$ par rapport celle de la période préindustrielle. (Fig. 1)

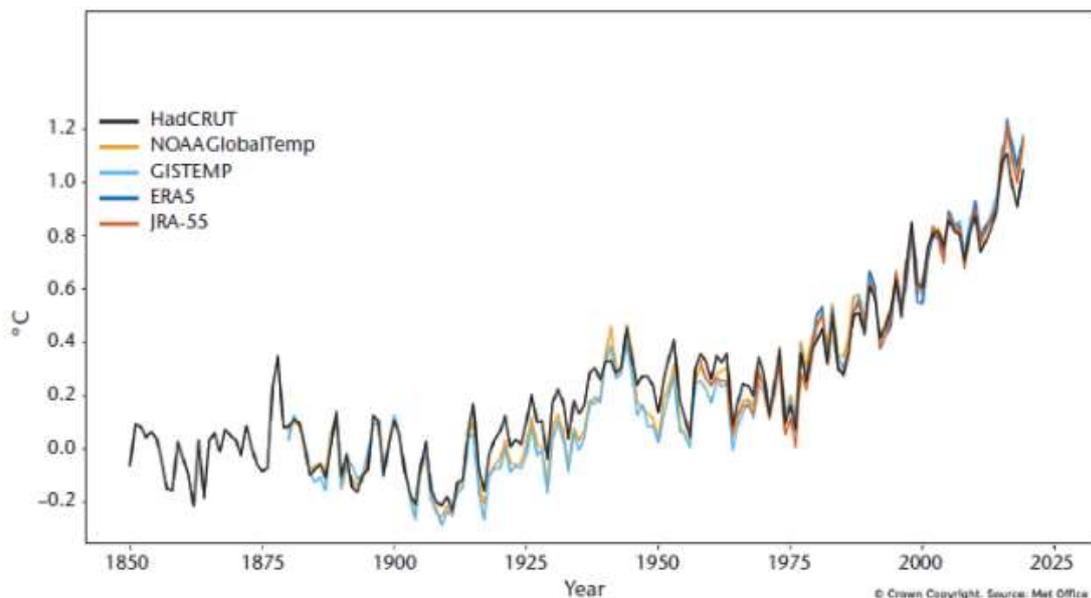


Figure 1. Evolution de la température moyenne planétaire relativement à la période 1850 - 1900. (WMO Statement on the State of the Global Climate in 2019)

Il est maintenant acquis que cette augmentation de la température globale a pour principale cause l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre d'origine anthropogénique.

En 2015 un engagement a été pris par les pays membres lors de la COP21. Celui-ci vise à maintenir le réchauffement sous la barre des 2°C d'ici à 2100.

Le secteur des transports est un des axes majeurs de la réduction de l'émission de gaz à effet de serre. En 2017, ce secteur représentait 27% de l'émission totale de l'Europe des 28. (European Environment Agency)

Pour cela la France vise par exemple à une réduction de 29% de ses émissions dans le secteur des transports d'ici 2028.

Si l'on regarde plus précisément les différentes contributions, on peut observer que 72% du total est émis par le trafic routier. (Fig 2.)

44% de ces 72% provenant de voitures, il semble évident que l'un des moyens les plus efficaces pour réduire leur émission passera par l'utilisation de carburant plus propre.

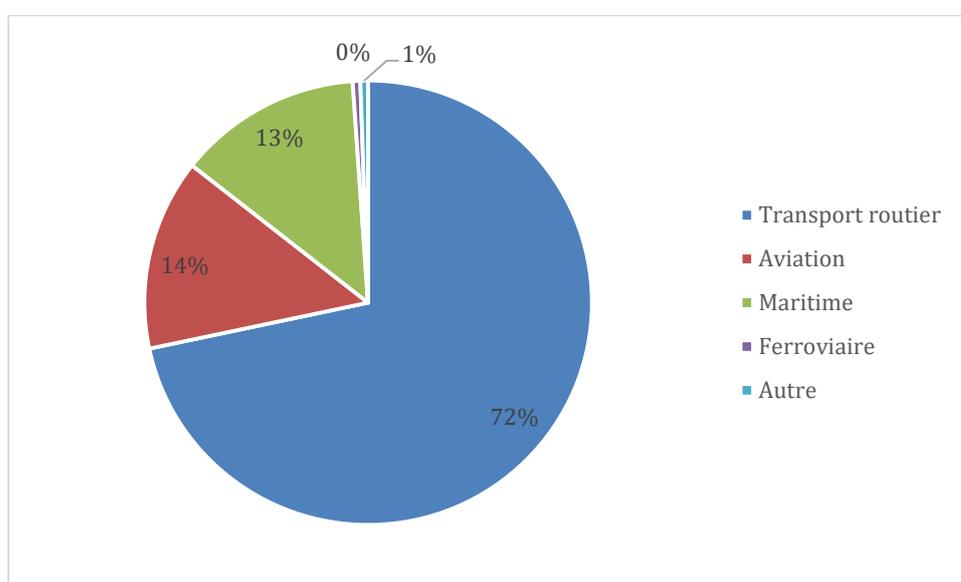


Figure 2. Parts des émissions de gaz à effet de serres par secteur en Europe en 2017. (<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/transport-emissions-of-greenhouse-gases/transport-emissions-of-greenhouse-gases-12>)

2.1. Biocarburants

Un biocarburant est un carburant liquide ou gazeux issu de la biomasse (matériaux organiques non fossiles).

Leur utilisation remonte au tout début de l'industrie automobile, époque où les carburants fossiles n'étaient pas autant présents. L'inventeur du moteur à combustion interne, Nikolaus Otto, avait d'ailleurs conçu son moteur pour

fonctionner avec de l'éthanol. Rudolf Diesel créa lui aussi son moteur pour une utilisation avec de l'huile d'arachide.

Au milieu du XXe siècle le faible coût du pétrole et son abondance ont permis un essor considérable de l'automobile et la disparition quasi complète de l'utilisation de ces biocarburants.

Avec les chocs pétroliers des années 70, et l'augmentation du prix des énergies fossiles, ont vu jour des politiques de sécurité énergétique domestique menant à un nouvel intérêt pour ces biocarburants. Le Brésil se porte en fer de lance de cette nouvelle économie avec son plan pro alcool, suivi de près par les Etats-Unis, à la recherche d'indépendance énergétique.

L'intérêt retombe avec le contre choc pétrolier de 1986 jusqu'aux années 2000 ou un regain d'intérêt permet à ces technologies de revenir sur le devant de la scène.

L'émergence de la production de ces biocarburants, à l'interface entre énergie et agriculture a d'ailleurs été l'un des plus gros développements agricoles de ces dernières années.

Mais rapidement, des critiques sont apparues, principalement autour d'effet négatif comme la déforestation, la promotion de la monoculture intensive et la perte de biodiversité.

La crise alimentaire de 2007-2008 a aussi permis d'ouvrir le débat sur l'allocation de terres cultivables pour les biocarburants au détriment de la production de nourriture (Food vs Fuel).

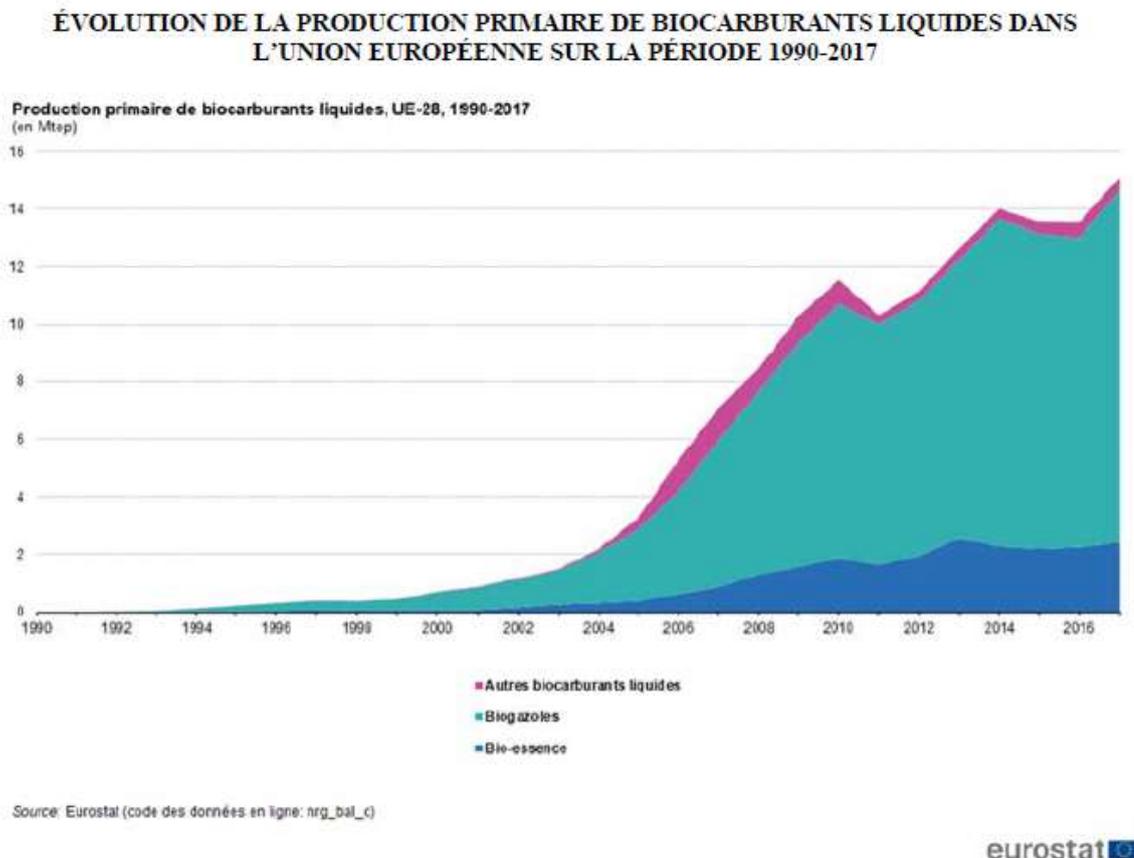
Le Journal Officiel de la République Française du 19 septembre 2018 définit deux générations de biocarburants.

La Première génération comprend les carburants constitués d'alcools, d'huiles, d'esters d'huiles ou d'hydrocarbures qui sont obtenus après transformation de produits agricoles destinés habituellement à l'alimentation humaine ou animale. (Les produits agricoles utilisés proviennent notamment de plantes sucrières, amylacées ou oléagineuses).

La Deuxième génération est constituée de composés oxygénés ou d'hydrocarbures qui sont obtenus à partir de bois, de cultures spécifiques non destinées à l'alimentation humaine ou animale, de résidus agricoles et forestiers ou de déchets ménagers.

Leur utilisation dans le secteur des transports les voit mélangés en diverses proportions aux carburants d'origine fossile.

Aujourd'hui les carburants de première génération représentent la grande majorité de la production mondiale.



Les carburants de seconde génération sont aux prémices de leur phase d'industrialisation. Il existe actuellement quelques unités de production en Europe ou aux Etats-Unis mais cela représente par exemple seulement 2% de la production américaine de biocarburants en 2018.

Figure 3. Evolution de la production de biocarburants liquides dans l'union Européenne 1900-2017

2.1.1. BIOCARBURANTS DE PREMIERE GENERATION

Actuellement, pratiquement toute la production de biocarburants française s'appuie sur des biocarburants de première génération (exclusivement à partir de ressources agricoles à consommation alimentaire)

Cette production est majoritairement axée sur le biodiésel, les matières premières sont des huiles provenant de graines de plantes oléagineuses comme le colza, le tournesol, le soja ou l'huile de palme.

Après extraction, ces huiles subissent une trans estérification permettant l'obtention d'un ester d'acide gras (fatty acid methyl esters or FAME).

Pour cela on les mélange en général avec du méthanol en présence d'un catalyseur (principalement une solution alcaline (Fjerbaek et al., 2009).

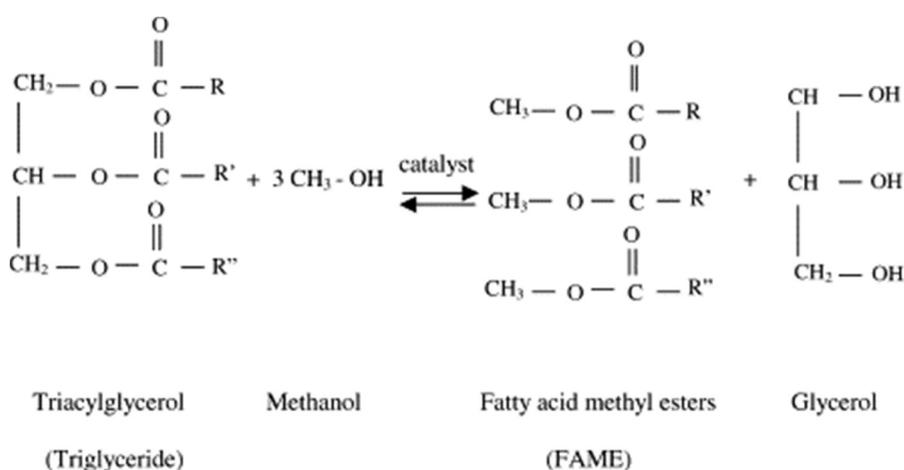


Figure 4. Production de FAME (Y. Zhang et al., 2003)

En 2017, en France, les biocarburants représentaient 7.7% de l'énergie provenant du gazole (80% du marché des carburants routiers en 2017 *UFIP, Ventes de carburants routiers et structure du réseau de distribution en France au cours l'année 2018, p. 5, disponible sur : https://www.ufip.fr/uploads/pdf/tude_r%C3%A9seau_2018_juillet_2019.pdf*), principalement incorporés dans le gazole B7 (pouvant contenir jusqu'à 7% de biodiésel).

Un gazole B10 a été homologué en 2018 mais est encore très peu utilisé. Enfin, il existe du B30 et du B100 mais leur utilisation reste très anecdotique.

A l'international la production de biodiésel est dominée par les pays de l'Union Européenne, suivis de près par les Etats-Unis. Ce marché est principalement domestique ce qui explique des chiffres de consommation assez similaires à ceux de la production.

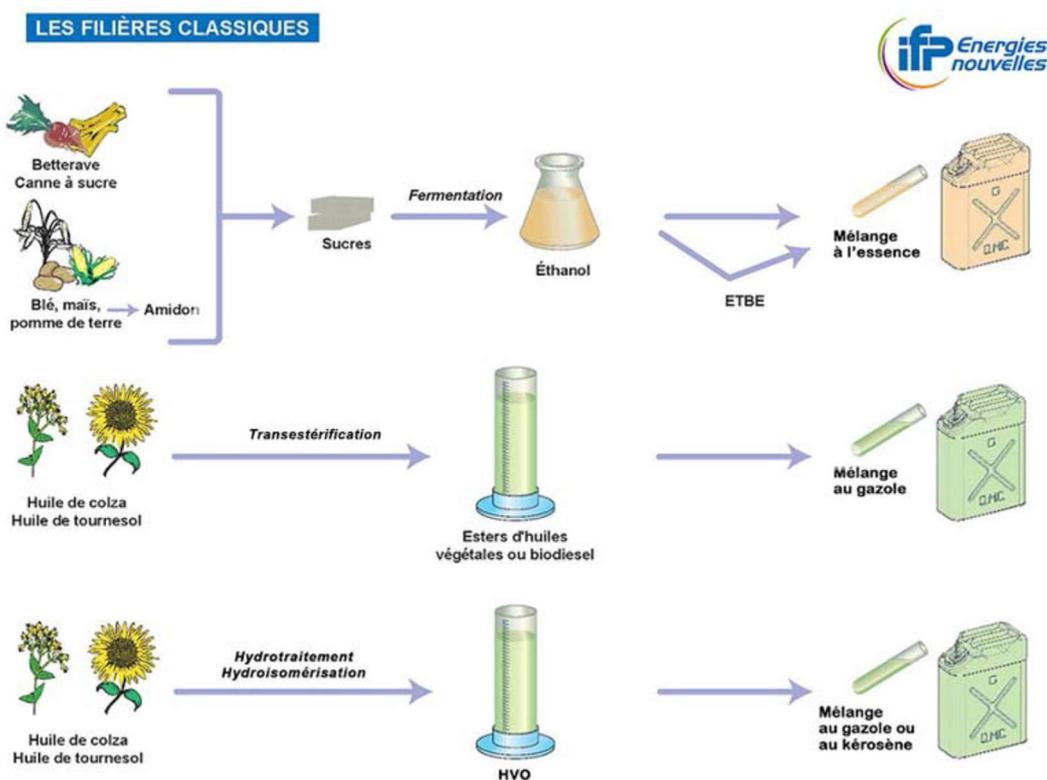


Figure 5. Filières classiques de biocarburants

Source : IFP énergies nouvelles : <https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energiesrenouvelables/quel-avenir-les-biocarburants>

Le bioéthanol de première génération est un alcool produit par la fermentation de sucres provenant soit directement de plantes (betteraves, canne à sucre) soit de l'amidon de certaines céréales (blé, maïs).

Il peut être utilisé sous sa forme alcoolique mais en Europe, il est principalement transformé en éthyle tertio butyle éther (ETBE) par réaction avec de l'isobutène.

La fermentation des sucres par des levures classiques crée un alcool brut qui sera soumis à une distillation puis une déshydratation pour obtenir du bioéthanol.

En France ce bioéthanol est principalement écoulé à travers les SP95-E10 (10% éthanol en volume) qui représente 43% du volume des ventes pour les essences (en augmentation face au diesel).

Un carburant E85 composé à 85% de bioéthanol est aussi disponible mais il représente une part faible de la consommation (2.5% du marché des essences).

La production mondiale de bioéthanol est portée par 2 acteurs principaux que sont les Etats-Unis avec 48.2% de la production, principalement à partir de maïs et le Brésil avec 26.2% à partir de canne à sucre et de maïs. (Fig 6.)

	Production ranking (base period)		Major feedstocks	
	Ethanol	Biodiesel	Ethanol	Biodiesel
United States	1 (48.2%)	2 (19.5%)	Maize	Soybean oil
European Union	4 (4.9%)	1 (34.1%)	Sugar beet /wheat /maize	Rapeseed oil / used cooking oils
Brazil	2 (26.2%)	4 (12.0%)	Sugarcane / maize	Soybean oil
China	3 (8.1%)	8 (2.2%)	Maize / cassava	Used cooking oils
India	6 (2.1%)	14 (0.4%)	Molasses	Used cooking oils
Canada	7 (1.4%)	10 (0.7%)	Maize / wheat	Canola oil / soybean oil
Indonesia	21 (0.2%)	3 (12.3%)	Molasses	Palm oil
Argentina	9 (0.9%)	5 (6.6%)	Molasses / maize	Soybean oil
Thailand	8 (1.4%)	6 (3.6%)	Molasses / cassava	Palm oil
Colombia	13 (0.4%)	10(1.4%)	Sugarcane	Palm oil
Paraguay	14 (0.4%)	17 (0.03%)	Sugarcane	Soybean oil

Note: Numbers refer to the position that countries take in global production ranking; percentage numbers refer to the production share of countries in the base period.

1. Biodiesel includes renewable diesel (also known as Hydrotreated Vegetable Oil or HVO) in the accounting of this *Outlook* although both are different products.

Source: OECD/FAO (2020), "OECD-FAO Agricultural Outlook", OECD Agriculture statistics (database), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>.

Figure 6. Classement des pays producteurs de biocarburants et leurs principales sources.

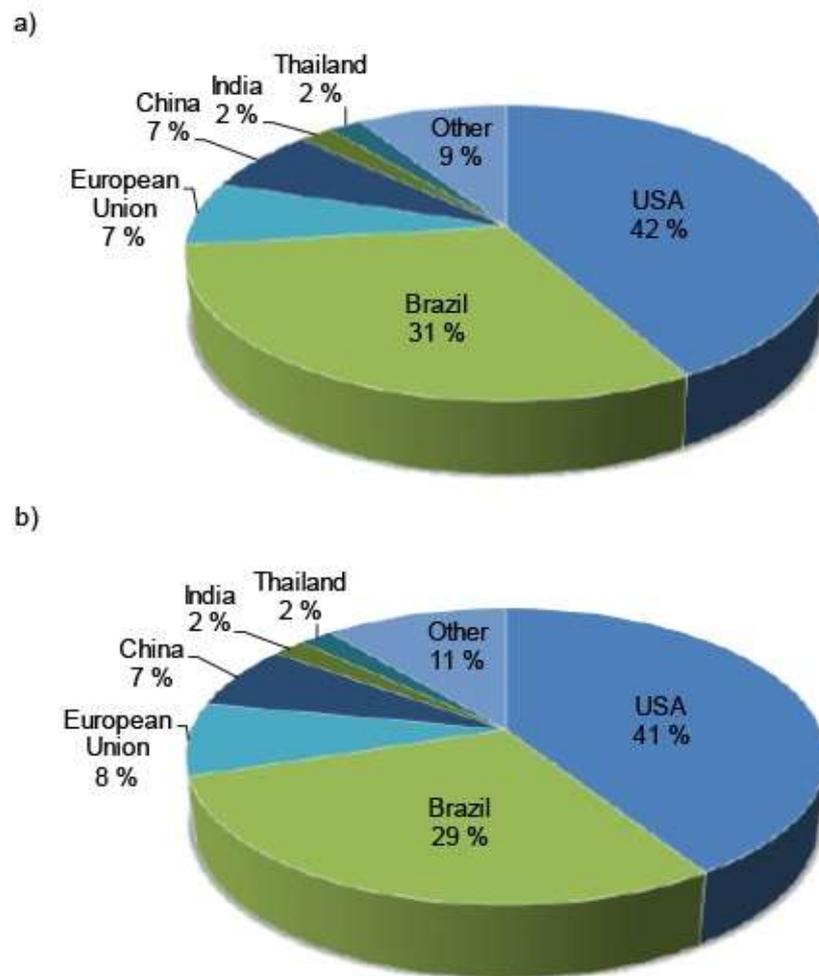


Figure 7. Prédiction de la production (a.) et de la consommation (b.) de bioéthanol à l'échelle mondiale d'ici 2024. (OCDE 2015) (Bušić et al., 2018)

2.1.1.1. Première génération et développement durable

De nombreuses études ont démontré un véritable effet positif sur le bilan énergétique global des biocarburants de première génération. Le bilan des biodiesel est de loin le meilleur, avec une réduction de consommation d'énergie non renouvelable allant de 65% à 82%.

Les éthanol ont un bilan un peu plus faible au vu de la demande énergétique pour leurs productions (distillation). La réduction de consommation d'énergie non renouvelable atteint tout de même entre 49% (éthanol de blé) et 85%

(éthanol de canne à sucre). Le bilan est un peu plus faible pour les ETBE avec des gains énergétiques de 18% à 54%.

D'un point de vue géopolitique, la réduction de la dépendance aux carburants fossiles importés peut représenter une véritable force pour les pays comme la France. En 2017 les biocarburants représentaient près de 9.1% de la consommation française de carburants, réduisant d'autant les importations provenant de pays producteurs de pétrole.

Une des critiques de ces biocarburants de premières génération est le changement d'affectations des sols, qui peut être direct (déforestation...) ou indirect et qui peut grever le bilan net des émissions de Gaz à effet de serre. Cette problématique est fortement liée aux modes de culture et en grande partie présente dans des pays hors France.

Du fait de ces changements d'affectation des sols, et de la préférence à faire pousser de la biomasse pour biocarburants plutôt que de la nourriture, les biocarburants de première génération sont accusés de contribuer à la hausse des prix alimentaires, même s'il existe de nombreuses controverses à ce sujet.

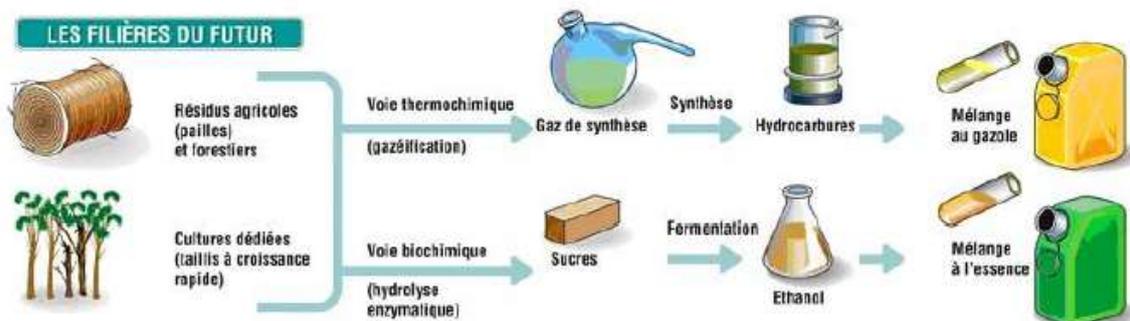
2.1.2. BIOCABURANTS DE 2EME GENERATION

Les biocarburants de seconde génération utilisent des biomasses lignocellulosiques comme matière première. Celles-ci sont des composants carbonés ligneux non utilisés dans la production alimentaire.

La plupart des technologies permettant la production de cette seconde génération de biocarburants ne sont pas encore déployées à l'échelle industrielle.

La production de biodiésel se fait par une première étape de transformation en gaz (syngaz). Cette étape nécessite des conditions très drastiques en pression, ce qui rend son développement économique compliqué. Le procédé de Fischer-Tropsch peut ensuite être utilisé pour transformer ce syngaz en bio gazole à l'aide de catalyseurs.

La production de bioéthanol de seconde génération se réalise par voie biochimique. La biomasse est prétraitée pour rendre accessibles les sucres complexes à des enzymes qui vont permettre de récupérer des sucres fermentescibles par le procédé classique de fermentation. (Fig8.)



Source : Ministère de la Transition écologique et solidaire, <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/biocarburants>.

Figure 8. Futur des biocarburants

2.2. Bioéthanol

L'éthanol, ou alcool éthylique est un alcool primaire à deux carbones de formule $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$). Liquide inflammable volatil et miscible dans l'eau.

L'éthanol est une source d'énergie prometteuse face à l'essence grâce à plusieurs avantages. Même si un litre d'éthanol ne contient que 66% de l'énergie contenue dans 1 litre d'essence, son indice d'octane plus élevé (110 vs 95) permet d'améliorer les performances d'un mélange éthanol/essence.

Cet indice d'octane élevé permet aussi à l'éthanol une combustion avec un taux de compression plus élevé entraînant un meilleur rendement et une diminution du cliquetis (inflammations locales et destructives du mélange).

La plus grande enthalpie de vaporisation de l'éthanol (840kJ/Kg), comparée à celle de l'essence (384kJ/Kg) permet à un mélange éthanol/essence d'être plus efficace, entraînant une augmentation de la puissance et du couple.

Finalement la présence de presque 35% d'oxygène dans l'éthanol, lui assure une meilleure combustion, diminuant de ce fait l'émission de particules et d'oxyde d'azote.

2.2.1. PREMIERE GENERATION

Comme énoncé précédemment, le bioéthanol de première génération provient majoritairement de sources de sucre simples, ou de sources d'amidon.

Les plantes sources de sucres simples sont principalement la canne à sucre, la betterave et le sorgho à sucre, et à une moindre échelle des fruits comme le raisin, les dattes, la pastèque ou la pomme. Les molasses, qui sont des résidus des raffineries sucrières, peuvent aussi être utilisées.

Leur avantage principal est une forte teneur en sucre et des coûts de conversion très faibles. Leur point faible est leur saisonnalité.

Pour les plantes sources d'amidons, on retrouve des céréales (60-80% amidon), des racines et tubercules (60-90% amidons), certains légumes et des fruits immatures. Le maïs reste quand même la source principale de bioéthanol notamment aux Etats-Unis, en Asie et en Amérique Latine. Les avantages de ces sources d'amidons sont la facilité de conversion en éthanol, une capacité de stockage et de conservation sur une longue durée contrairement aux sources de sucres simples. Leur rendement éthanol est plus élevé. (Zabed et al., 2017a)

H. Zabed et al.

Renewable and Sustainable Energy Reviews 71 (2017) 475–501

Table 1
Potential of some sugary biomasses as ethanol feedstocks.

Biomass	Major influential features	Reference
Sugarcane (<i>Saccharum officinarum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● High biomass yield ● High sucrose content ● High efficiency to accumulate solar energy ● Global production is 360 million ton/year ● Crop yield is 60–79.5 t/ha ● Residues are good source for generating electricity and 2nd generation bioethanol 	[18,19]
Sweet sorghum (<i>Sorghum bicolor</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● More drought tolerant crop than sugarcane ● Can grow in the arid land ● Stalk juice is a promising feedstock for bioethanol, while grains are used for food and starch based ethanol production ● Stalks contain significant amounts of sucrose, glucose and fructose ● Average syrup yield from stalk is 1900 L/ha 	[1]
Sugar beet (<i>Beta vulgaris</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● Major source of sugars in Europe and North America ● Crop yield is 79.1 t/ha ● Average syrup yield is 60–120 t/ha ● Average ethanol yield is 95 L/ton of stalk 	[1,18]
Watermelon (<i>Citrullus lanatus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● Around 20% of waste watermelons during or after harvesting of crops can be used as bioethanol feedstock ● Juice can be used as a diluent for molasses that increases overall sugar content in the feedstock and reduce water consumption 	[20]
Dates (<i>Phoenix dactylifera</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● A good amounts of dates are wasted each year in the date producing countries, which can be used as ethanol feedstock ● Contains high amounts of individual sugars (sucrose, glucose and fructose) as estimated for roughly 70% of total sugars ● Long time storage 	[21]
Molasses	<ul style="list-style-type: none"> ● A renowned ethanol feedstock enriched with sucrose, glucose and fructose ● An industrial waste and thus no debate of food versus fuel. ● Valorization of the waste material ● Molasses yield is approximately 3–7 t/100 t of sugarcane 	[19]

Figure 9. liste de de différentes biomasse utilisées pour produire du bioéthanol et leurs avantages.

2.2.2. DEUXIEME GENERATION

La production de bioéthanol de deuxième génération en est encore au tout début de son industrialisation, de nombreuses étapes demandent à être améliorées en vue de rendre le procédé économiquement viable.

En premier lieu, l'utilisation de biomasse lignocellulosique pose un problème d'approvisionnement, l'utilisation de déchets agricoles implique un ramassage de ces déchets, le plus souvent laissés en plein champ, et donc une mécanisation et des investissements pour les agriculteurs.

La solution de cultures dédiées (miscanthus, switch gras...) pose quant à elle des problèmes au niveau de la rotation des cultures et de la monopolisation de terres arables.

En second lieu, la structure hautement imbriquée de différentes macromolécules constituant ces biomasses impose le recours à des prétraitements, complexes et coûteux pour permettre les déstructurations et l'accès à des enzymes spécialisées.

Troisièmement, ces enzymes ou cocktails enzymatiques ont pour le moment un coût et un impact carbone très important, grevant le cycle de vie du procédé.

Finalement, la présence d'inhibiteurs et la faible concentration de sucres fermentescibles imposent de travailler en forte concentration de matières sèches pour pouvoir atteindre des quantités d'éthanol facilement distillables, ce qui rend la fermentation délicate. (Zacchi & Axelsson, 1989)

Ces différents points seront développés dans la suite de ce manuscrit.

2.3. Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est la ressource la plus abondante sur terre en vue de la production de biocarburant. Présente sur toute la surface terrestre elle est représentée par la grande majorité des plantes, arbres, arbustes et herbes.

Ces organismes produisent en effet les trois composés principaux que sont la lignine, l'hémicellulose et la cellulose (en proportion variables) et qui s'agencent entre eux de manière complexe.

Ces molécules, polymères osidiques pour la cellulose et l'hémicellulose, et polymère poly phénolique pour la lignine, s'organisent en structure fibrillaire et s'agencent dans l'espace pour former la structure de la paroi cellulaire et permettre le maintien, la rigidité et la vascularisation de la grande majorité des végétaux.

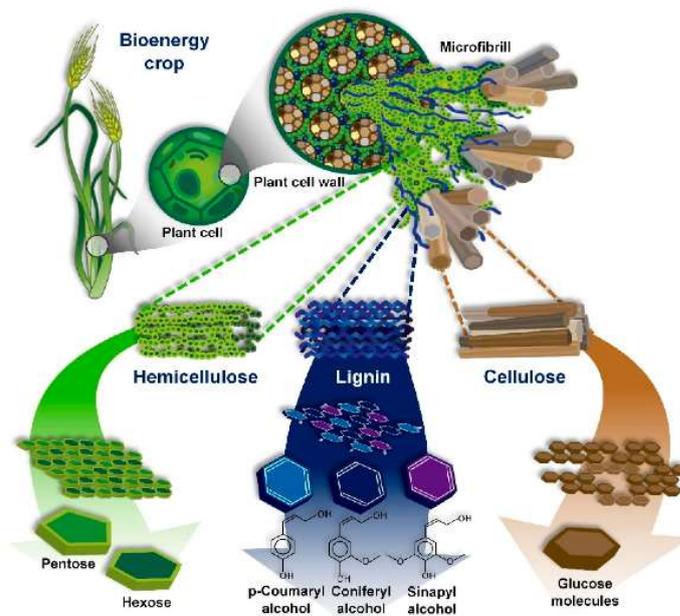


Figure 10. Structure de la lignocellulose et de ces bio polymères : cellulose, hémicelluloses et lignine (Hernández-Beltrán et al., 2019).

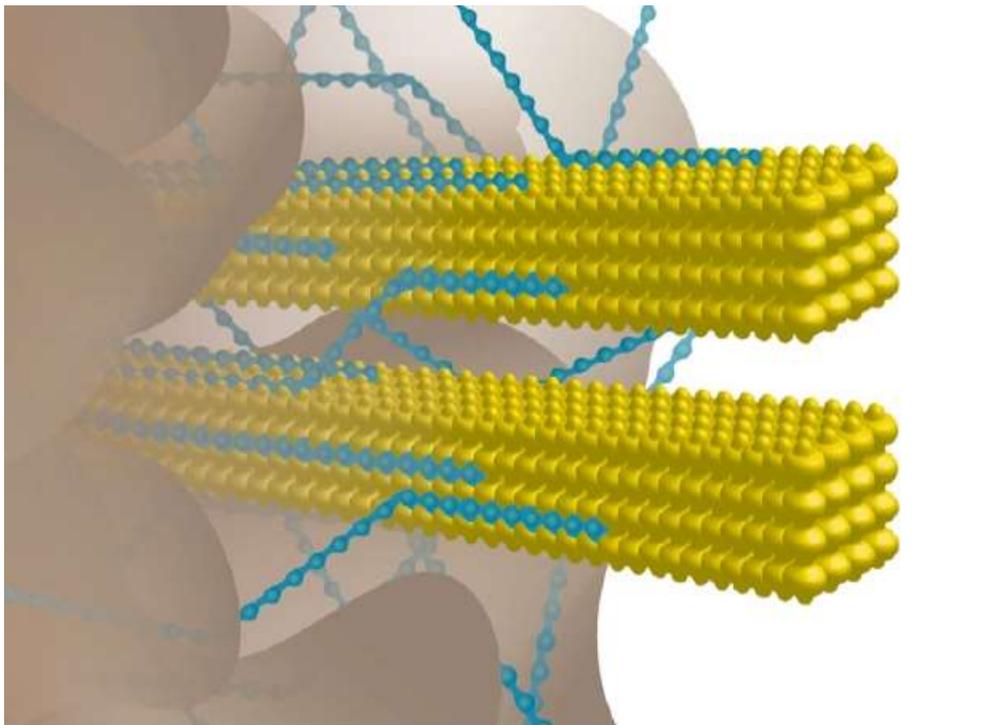


Figure 11 Représentation schématique de la structure générale de la paroi secondaire des végétaux. Les micro fibrilles de cellulose composée de chaînes de glucane sont représentées en jaune. Les hémicelluloses sont représentés en bleu, ces hémicelluloses se lient à la surface des micro fibrilles par des liaisons hydrogène. Enfin en marron est représenté le réseau de lignine, celui-ci entoure et pénètre dans le réseau cellulose – hémicellulose. (Marriott et al., 2016)

2.3.1. La cellulose

La cellulose est un glucide homopolymère linéaire présent dans toutes les espèces végétales. Son motif de répétition est le dimère cellobiose composé de deux unités de D-glucoses reliées entre elles par des liaisons glycosidiques $\beta(1\rightarrow4)$, ce qui le différencie de l'amidon (liaisons glycosidiques alpha). (Fig 11.)

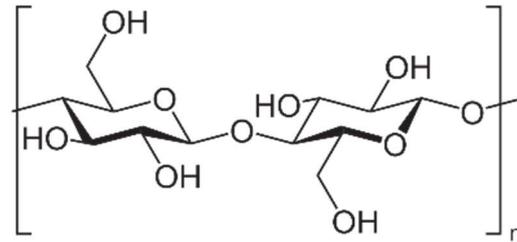


Figure 12. Molécule de cellobiose

Les chaînes linéaires de glucose, grâce à des liaisons hydrogènes, sont capables de former des microfibrilles au sein desquelles se succèdent des zones amorphes ainsi que cristallines (50 à 70 %)(Ragauskas et al., 2006). Le degré de polymérisation de ces chaînes est très variable (entre 300 et 10000 unités) selon le type de cellulose. Il est de nos jours communément admis que la cellulose est synthétisée par un complexe enzymatique comprenant six groupes de trois celluloses synthases (CESA) glycosyltransférases formant ainsi des microfibrilles composées de 18 chaînes (Baker et al., 2000; Nixon et al., 2016). Ces chaînes s'organisent sous forme d'hélice formant un réseau tridimensionnel et cristallin. (fig. 3.)

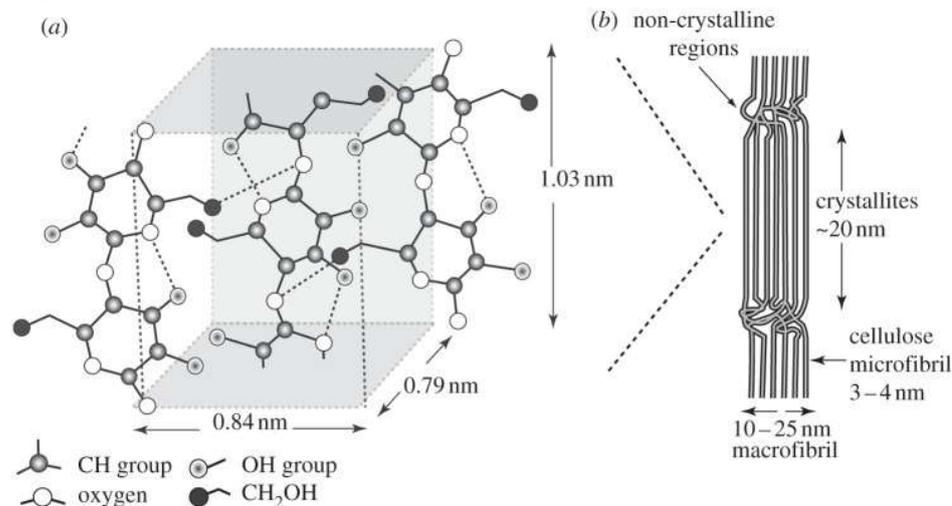


Figure 13. (a). Structure moléculaire de la cellulose, les molécules de glucose adoptent alternativement une rotation de 180° (b). Microfibrille de cellulose comportant des parties cristalline et amorphes qui s'agrègent en macrofibrille (Gibson, 2012)

La cellulose est considérée comme la matière organique la plus abondante sur terre avec une estimation de production de 180 milliards de tonnes par an. (Festucci-Buselli et al., 2007). L'humain en fait une utilisation intensive depuis des siècles sous différentes formes, le coton, le bois et d'autres plantes fibreuses, permettant de construire, chauffer ou tisser.

Sous sa forme pure, nous l'utilisons depuis plus de 150 ans, pour des applications aussi variées que le papier/cartons, les explosifs, les films photographiques, la fabrication de polymères thermoplastiques ou de fibres synthétiques. (Klemm et al., 2005).

De nos jours, la cellulose est encore un vaste champ de recherche qui devrait permettre d'augmenter le nombre de ses utilisations d'un point de vue industriel et ainsi découvrir de nouvelles applications à ce fascinant bio polymère écologique et biocompatible.

2.3.2. Les hémicelluloses

On parle ici des hémicelluloses au pluriel, en effet contrairement à la cellulose, plusieurs polysaccharides peuvent former les hémicelluloses.

Les hémicelluloses sont des hétéro polymères pouvant contenir différents monomères de sucres, des hexoses (beta-mannose, Beta-D glucose, Alpha-D-galactose) mais aussi et principalement des pentoses (Beta-D-xylose, alpha-D-arabinose...). On peut aussi trouver de l'acide uronique (alpha-D-acide glucuronique). Les ratios de ces différents sucres varient énormément entre les différentes biomasses. (Gírio et al., 2010)

Les hémicelluloses forment des chaînes longues qui s'associent par des liaisons hydrogènes et qui de ce fait permettent le maintien des fibrilles de cellulose. Elles forment aussi des liaisons covalentes avec les lignines permettant la construction d'une matrice cellulose-hémicellulose-lignines.

2.3.2.1. Galactoglucomannanes (GGMs)

Les O-acétyl-galactoglucomannanes, ou GGM sont les principales hémicelluloses retrouvées dans les conifères, entre 20-25% de la masse sèche.

Ils consistent en une chaîne pilier de β -d-glucopyranosyl et β -d-mannopyranosyl liés par des liaisons osidiques β -(1,4).

2.3.2.2. Glucuronoxylans (GX)

Les *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan sont les hémicelluloses principales des bois durs ou feuillus, dont ils représentent 15 à 30% de la masse sèche.

Ils consistent en une chaîne pilier de plusieurs unités de β -d-xylopyranosyl liées par des liaisons osmiques β -(1,4), certaines unités de xylose sont acétylées sur le C2 et C3 (8% and 17%) et environ 10% possèdent un groupe acide uranique attaché par une liaison α -(1,2).

Le degré de polymérisation moyen est d'environ 100 à 200 unités (Gírio et al., 2010).

2.3.2.3. Arabinoglucuronoxylans (AGXs)

Les arabino-4-*O*-methylglucuronoxylans sont les composants majeurs des plantes non ligneuses (cultures agricoles) et un composant mineur des résineux (5% à 10% de la masse sèche). Ils consistent en une chaîne pilier de plusieurs unités β -(1,4)-d-xylopyranose liées par des liaisons osidiques α -(1,2) and α -(1,3).

Le degré de polymérisation moyen est d'environ 50 à 185 unités. (Gírio et al., 2010)

2.3.2.4. Xyloglucans (XGs)

Les xyloglucans sont quantitativement les composés hémicellulosiques prédominants dans la paroi cellulaire primaire des bois durs. Ils consistent en une chaîne pilier de plusieurs unités β -1,4-linked d-glucose dont 75% des résidus sont substitués par du D-xylose. Les xyloglucans contribuent à l'intégrité structurelle du réseau cellulosique en interagissant avec les microfibrilles de cellulose grâce à la formation de liaison hydrogène. (de Vries & Visser, 2001)

2.3.2.5. Arabinoxylans (AXs)

Les arabinoxylans représentent la structure hémicellulosique principale de la paroi cellulaire des grains de céréales. Ils sont structurellement similaires aux xylans des bois durs mais avec un ratio de L-arabinose beaucoup plus élevé.

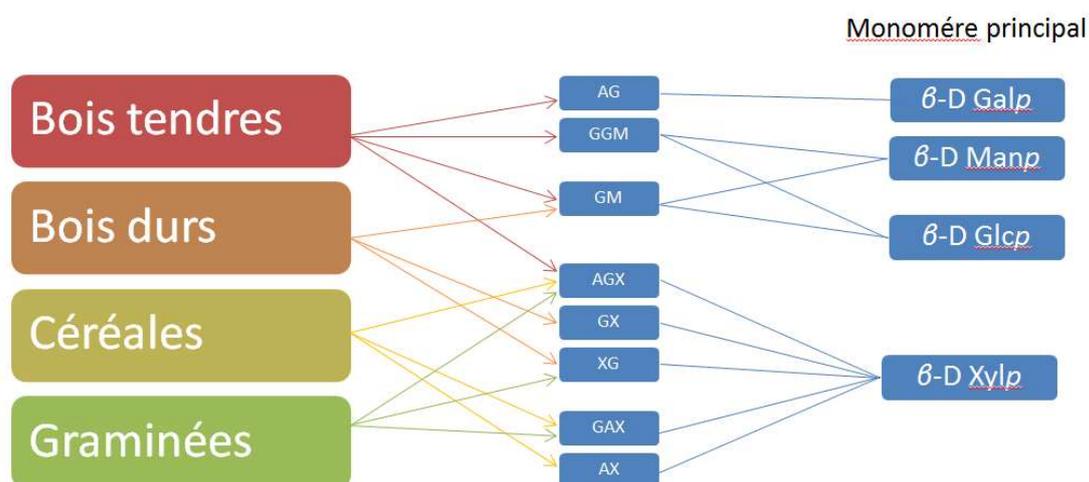


Figure 14 Hémicelluloses et leurs monomères principaux présent dans les différents types de végétaux.. AG :Arabinogalactane ; GGM : Galactoglucomannane. GM :Glucomannane ; AGX : Arabinoglucuronoxylane ; GX : Glucuronoxylane ; XG : Xyloglucane ; GAX :Glucuronoarabioxylane ; AX : Arabinoxylan.(Gírio et al., 2010)

2.3.3. Lignine

Les lignines sont des hétéropolymères amorphes composés d'unités de phénylpropanoïdes.

Ces monomères principaux sont les trois alcools p-hydroxycinnamyl : p-coumaryl Mh, coniferyl Mg and sinapyl Ms.

Dans le polymère, ceux-ci produisent des unités p-hydroxyphenyl PH, guaiacyl PG et syringyl PS. Les liaisons inter-unités les plus rencontrées sont de type aryl-aryl-ether. La lignine est particulièrement associée avec les polysaccharides de l'hémicellulose.

Les plantes utilisent la lignine pour augmenter la solidité structurelle des composés cellulaires, contrôler les flux liquides, se protéger contre les attaques des microorganismes, mais aussi en tant qu'antioxydant ou que protection contre les UVs. Elle est susceptible d'être un retardateur de combustion.

De par leur degré de réticulation important, les lignines sont insolubles dans la plupart des solvants.

La composition des lignines est de nature différente dans les bois tendres, les bois durs et les graminées.

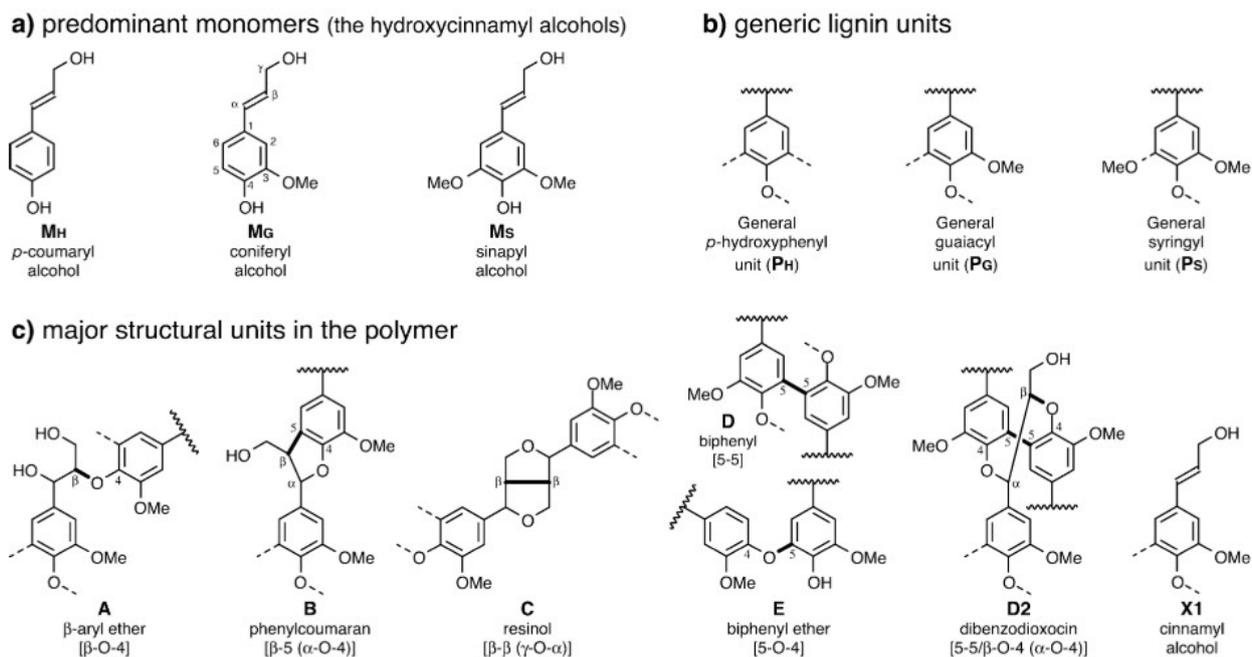


Figure 15 a) Les Monolignols M : monomères ligneux primaire b) Polymère de lignine P annoté selon la substituons methoxyle sur l'anneau aromatique c) unités structurelle majoritaire dans le polymère (Ralph et al., 2004)

2.4. Prétraitement

La production de bioéthanol de seconde génération est un processus complexe qui implique de nombreuses étapes.

En premier lieu, une étape de conditionnement va permettre de pouvoir réduire la taille du substrat et de pouvoir le stocker dans de bonnes conditions. Pour cela la biomasse va subir un séchage et un broyage plus ou moins grossier.

Par la suite, il va être nécessaire d'avoir recours à une phase de prétraitement qui permettra de rendre la structure de la biomasse lignocellulosique plus accessible aux enzymes pour la phase d'hydrolyse.

Les polysaccharides transformés en sucre simple vont par la suite pouvoir être fermentés, puis le moût sera distillé pour obtenir de l'éthanol.

Comme nous l'avons vu précédemment, la lignocellulose forme une structure rigide et très solide, pour permettre aux enzymes un accès aux différents composés. Il va être donc être nécessaire de déstructurer cette biomasse et de

séparer, au moins partiellement les différents composés que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Pour cela de nombreuses solutions ont été mises au point. Des traitements chimiques, physiques ou thermiques, voire des combinaisons de ces traitements ont permis d'atteindre des degrés de déstructuration très élevés, augmentant considérablement les rendements d'hydrolyse par rapport aux substrats de base. En voici une liste des principaux.

2.4.1. Traitement acide

Les traitements acides peuvent être séparés en 2 catégories.

En effet deux approches différentes s'opposent, soit l'utilisation d'acide concentré à faible température soit l'utilisation d'acide dilué à haute température.

Le plus souvent, l'acide sulfurique est utilisé, même si on note parfois l'utilisation d'acide chlorhydrique, nitrique ou trifluoroacétique.

2.4.2. Acide concentré

L'utilisation d'acide concentré permet l'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose. La solubilisation des polysaccharides est obtenue avec différentes concentrations d'acides. Les températures basses sont clairement un avantage de ce procédé permettant de réduire le coût opérationnel. D'un autre côté, la récupération des acides du prétraitement est essentielle pour pouvoir prétendre à une viabilité économique. (Y. H. P. Zhang et al., 2007)

De plus l'effet corrosif de ces acides forts sur les équipements peut être un frein à cette technique. Enfin, on peut retrouver la production de composé inhibiteur pour les levures permettant la fermentation. (Baruah et al., 2018)

2.4.3. Acide dilué

Le plus grand avantage de cette technique est la rapidité de la réaction qui permet de développer un procédé de traitement continu de la biomasse.

Après le prétraitement, l'utilisation d'enzymes n'est pas forcément nécessaire étant donné que l'utilisation d'acide permet l'hydrolyse de la biomasse en sucre fermentescibles. Il est toutefois nécessaire de bien laver la matière première pour éliminer les acides. L'acide sulfurique dilué est communément utilisé pour le prétraitement de Panic érigé (switch Grass/ *Panicum virgatum* L.), de Baldingère faux-roseau (*Phalaris arundinacea* L.) (Digman et al., 2010) ainsi que pour la

canne de maïs (Avci et al., 2013). Une hydrolyse rapide avec des rendements élevés a été rapportée.

Un des désavantages de ce procédé de prétraitement est, comme lors de l'utilisation d'acide concentré, la corrosivité des acides sur le matériel ainsi que la toxicité de ces composés.

On observe aussi la formation de produits de décomposition des sucres dont la concentration va dépendre de la température et qui vont agir comme des inhibiteurs de la fermentation. Principalement le furfural, l'hydroxy méthyl furfural (HMF), des aldéhydes mais aussi des acides phénoliques. (Avci et al., 2013).

2.4.4. Traitement alcalin

Les traitements alcalins ont gagné plus d'attention ces dernières années.

Le principe est de noyer la biomasse dans une solution alcaline tout en agitant et en maintenant la température désirée.

L'efficacité de ce prétraitement est conditionnée par la concentration en lignine de la biomasse mais a de nombreux avantages comparativement au traitement acide.

Le premier est l'utilisation de composés non polluants et non corosifs comme l'hydroxyde de sodium, le sulfite de sodium, hydroxyde de potassium, hydroxyde calcium, et les hydroxydes d'ammonium (Kim et al., 2016)

De plus, en agissant à de plus faibles températures et pressions, ils causent moins de dégradation des sucres et donc la production de moins de composés inhibiteurs.

Le prétraitement alcalin va hydrolyser les liaisons éther entre les lignines et l'acide férulique d'une part et l'acide férulique et les polysaccharides d'autre part. (Buranov & Mazza, 2008)

Enfin en limitant la condensation de la lignine ils permettent son élimination plus facilement, à condition que sa concentration soit plutôt faible.

Une étape de neutralisation est tout de même nécessaire avant hydrolyse enzymatique et fermentation pour se débarrasser des lignines et de certains composés inhibiteurs notamment des sels.

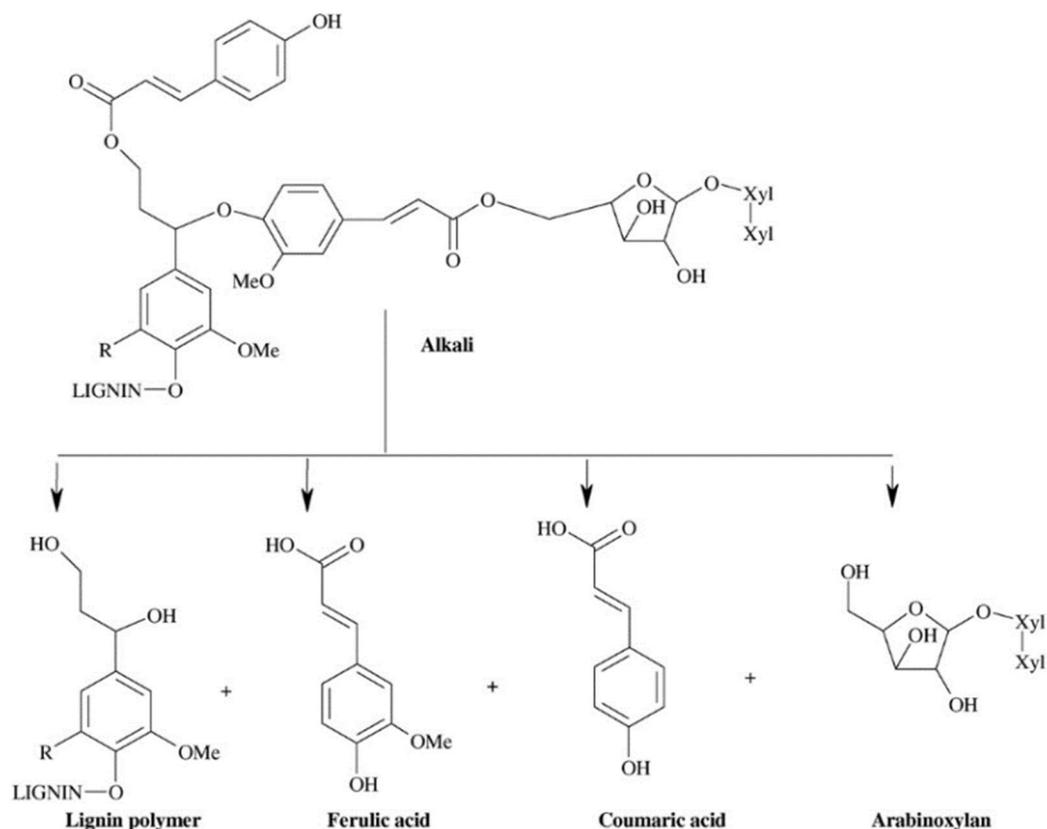


Figure 16 Complexe lignine-polysaccharide (LCC) de la paroi végétale de maïs et transformation par un agent alcalin (Buranov & Mazza, 2008)

2.4.5. Explosion à la vapeur

Ce procédé de prétraitement permet la déstructuration de la biomasse lignocellulosique en combinant la chaleur, l'hydrolyse découlant de la formation d'acides organiques et le cisaillement résultant d'une chute brutale de pression. Deux étapes se succèdent : le vapocraquage et la décompression explosive.

Lors des premières étapes la biomasse va être imprégnée par la vapeur sous haute pression. La température élevée et la condensation de l'eau vont initier l'hydrolyse du groupement acétyle et méthylglucuronique des xylanes. Cela va permettre la libération d'acides organiques, principalement acétique et uronique qui, à leur tour, entraînent la dépolymérisation de l'hémicellulose.

Les deuxièmes étapes consistent à provoquer une chute brutale de pression qui va vaporiser l'eau contenue dans la biomasse. Des forces de cisaillement très grandes vont engendrer l'éclatement mécanique de la lignocellulose, une séparation des fibres et la rupture de la paroi cellulaire.

Ce type de prétraitement est considéré comme un des plus écologiques du fait de la non-utilisation de produits chimiques. Il est déjà en phase de commercialisation.

Malgré ces avantages indéniables, ce procédé produit une dégradation partielle des sucres et des lignines entraînant la production de composés inhibiteurs solubles qui vont impacter les étapes de saccharification ou de fermentation (Alvira et al., 2016)(E. Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000)

2.4.6. Prétraitement des fibres à l'ammoniaque (AFEX)

Le principe de ce traitement est de faire subir à la biomasse un bain d'ammoniaque sous pression (100-400 psi) à 100-140°C pendant 15-30 minutes. Ce traitement permet une décristallisation et donc une meilleure digestibilité enzymatique de la cellulose, une hydrolyse des hémicelluloses, la dépolymérisation des lignines et une toxicité faible, essentielles pour la phase de fermentation. (Jin & Dale, 2018)

2.4.7. Organosolv

Le traitement Organosolv utilise des solvants organiques ou aqueux (éthanol, méthanol, éthylène glycol, acétone, glycérol...) pour extraire les lignines et ainsi permettre un accès plus facile à la cellulose.

La biomasse est mise à tremper avec ces solvants à de hautes températures (100-250°C). Le traitement permet de récupérer une grande partie des fibres de cellulose, la lignine solide et une solution liquide contenant les sucres hémicellulosiques clivés (principalement du D-xylose)(Tomás-Pejó et al., 2011). Son efficacité dans la fabrication de la pâte à papier n'est plus à prouver.

Dans un procédé de production de bioéthanol lignocellulosique, ces principaux avantages sont la production d'une cellulose très facilement hydrolysable, une élimination efficace de la lignine et la récupération de celle-ci en vue d'une réutilisation. Ces inconvénients sont la nécessité d'élimination et de récupération des solvants (évaporation, condensation...), le coût élevé de ces solvants et la formation d'une forte concentration d'inhibiteurs de fermentation (furfural, HMF et phénols (Gírio et al., 2010)).

2.4.8. Traitement thermo-mécano-chimique en extrudeur bivis

L'extrusion est un procédé industriel très répandu, indispensable en plasturgie il est aussi très présent dans le domaine agro- alimentaire. (Bouvier & Campanella, 2014).(Offiah et al., 2019)

La technologie bi vis offre en plus des fonctions proposées par les extrudeurs mono vis, à savoir le transport de matière, la compression/chauffage par friction et la mise en pression sous cisaillement, la possibilité de mélange à travers la rotation de deux vis identiques dans un fourreau ajusté à leur diamètre dont la section forme un huit.

Le profil de vis est extrêmement modulable du fait qu'il est constitué par un empilement de tronçons de vis installés sur deux arbres d'entraînement cannelés et parallèles. Un transport très efficace de la matière de l'entrée jusqu'à la sortie de l'extrudeur est assuré par une configuration co-rotative et co-pénétrantes des vis, conjuguée à un profil de vis de convoyage à pas direct, à pas simple ou double filet.

La zone d'interpénétration des vis constitue une première zone de mélange sous cisaillement, et la réduction du pas de vis de convoyage permet une mise en pression de la matière.

L'effet mélange peut aussi être renforcé par l'introduction d'éléments malaxeurs prenant la forme de monolobe ou bilobe dans lesquels la matière transportée peut s'accumuler en fonction du profil de montage, permettant un mélange intense avec les liquides introduits dans le fourreau.

Le montage d'éléments de vis à contrefilet, de diamètre légèrement plus faible que le fourreau ou ajourés permet de renforcer encore l'effet de compression de la matière. Celle-ci se retrouve convoyée à contre sens de celui des vis à pas direct et s'y accumule en formant un bouchon « dynamique ». La matière se retrouve, dans les contres filets, compressée par celle arrivant des vis à pas direct, entraînant des pressions très élevés (jusqu'à 10bars) et un cisaillement extrêmement fort. Ces paramètres sont contrôlés par la forme et le pas des contrefilets ainsi que leurs longueurs et la forme des ajourements. Ces combinaisons vont entraîner un échauffement et une modification structurelle de la matière qui va permettre son écoulement à travers les contrefilets pour être ensuite reprise par des pas de vis à pas direct permettant de nouveau le convoyage de cette matière.

En amont de cette zone de forte compression, il est donc possible d'installer un module de filtration qui va permettre de collecter un filtrat provenant de la compression axiale du substrat.

Finalement, en sortie de contrefilet, et selon la configuration, la matière va pouvoir subir une détente brutale, similaire à une explosion à la vapeur, lorsque la température et le taux d'humidité sont élevés.

En conclusion ce système de prétraitement bi vis va permettre, selon les choix de configuration, de soumettre la matière végétale à différentes opérations telles qu'un broyage, une fragmentation et une déstructuration suivie d'une filtration permettant la séparation liquide solide. Le tout en subissant un mélange efficace et continu sur toute la longueur de l'extrudeur.

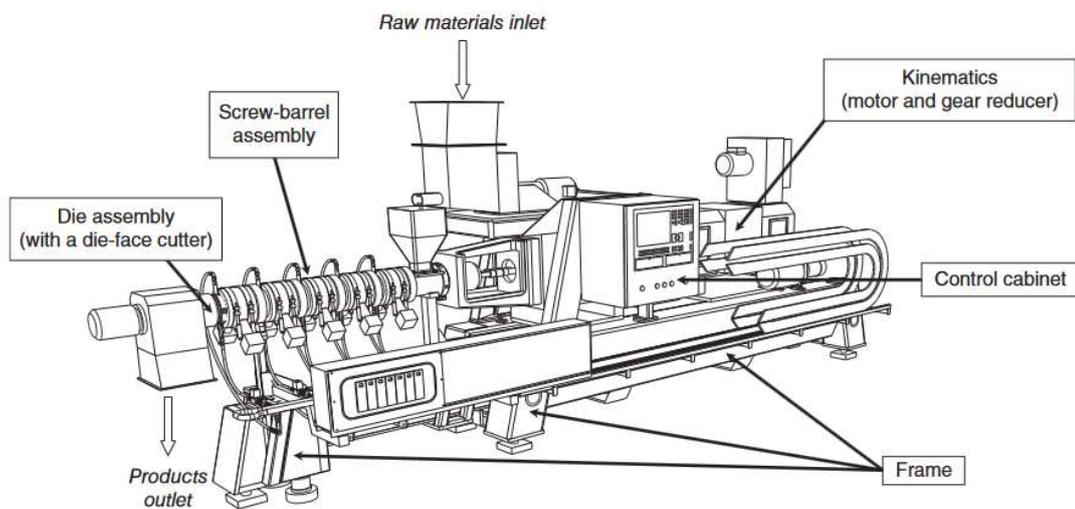


Figure 17. Schéma d'un extrudeur Bi-vis

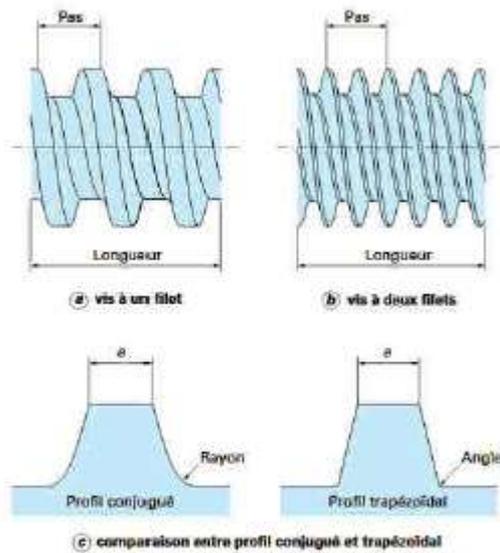


Figure 1.38 Schéma des caractéristiques des vis (Clextral, France)

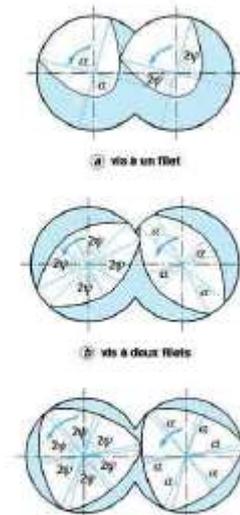


Figure 1.39 Schéma représentant les sections de vis conjuguées (Clextral)

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

Figure 18. schéma des différents types de vis

Le profil des vis est l'un des points clés du prétraitement de la biomasse lignocellulosique. En effet, il va permettre de définir le temps de séjour ainsi que les actions mécaniques appliquées à la matière. Des études portant sur l'influence des types de vis sur du résidu de maïs (Zheng & Rehmann, 2014) ont permis de démontrer une corrélation entre l'augmentation de la taille des pores à la surface

des fibres de cellulose/hémicelluloses et l'utilisation d'une majorité de vis de malaxage.

Il a été prouvé que l'utilisation de contrefilet(s) pouvait avoir un effet délétère en redistribuant la lignine à la surface des fibres, cela étant probablement dû à un échauffement incontrôlé de la matière.

Il a aussi été observé une amélioration des performances lorsque la température du fourreau est élevée jusqu'à un certain point, notamment lors d'extrusion réactive (injection de réactifs directement dans la matière).

Dans ces cas-là, le ratio liquide/solide a une importance : pas assez de liquide et la matière subira un échauffement au risque d'un blocage mécanique, trop de liquide et le temps de séjour se verra grandement réduit. Des tests ont été réalisés en extrusion mono vis par (Karunanithy & Muthukumarappan, 2010) et démontrent une forte influence de ce ratio sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique.

Le passage de la biomasse dans un extrudeur bi vis entraîne une déstructuration physique de la matière qui permet une diminution de la taille des particules, une défibrillation efficace et une augmentation de la surface accessible aux enzymes. Toutefois, cet effet thermomécanique est insuffisant pour obtenir des rendements élevés de conversion en sucres fermentescibles (supérieur à 60%) (Vandenbossche et al., 2014).

Duque et al., (2014) ont démontré que l'addition d'un traitement alcalin directement dans l'extrudeur permettait de grandement augmenter les rendements d'hydrolyse (plus de 80%). Une délignification atteignant 70% a été observée dans des conditions similaires (H. Liu et al., 2018).

Malgré sa grande efficacité, le traitement alcalin par extrusion bi vis (ATSE alkaline twin screw extrusion) nécessite par la suite un lavage intensif de la biomasse prétraitée en vue d'effectuer une fermentation efficace. En effet, la forte concentration en sels et le pH très élevé ne sont pas propices au développement de microorganismes.

Pour limiter l'utilisation de grandes quantités d'eau, un tamponnage du substrat par acidification directement dans l'extrudeur a été mis en place (Vandenbossche et al., 2016), notamment dans le projet BABETHANOL.

Notre étude concerne aussi l'ajout d'une phase de filtration possible grâce à la présence de contrefilets sur les bi-vis, qui induisent une compression de la matière et la diminution du ratio liquide/solide. Cette filtration permet l'élimination d'une grande partie des sels et des produits de dégradation issus du traitement alcalin qui pourraient porter atteinte au bon déroulement de la fermentation.

Finalement une dernière étape d'imprégnation par un cocktail enzymatique directement dans l'extrudeur a été rajoutée. Cette étape, nommée bioextrusion, permet un mélange efficace et rapide du cocktail enzymatique avec la biomasse traitée et un démarrage rapide de l'hydrolyse enzymatique.

Le substrat prétraité en sortie d'extrudeur devient donc directement hydrolysable sans ajout complémentaire d'enzymes.

2.5. Hydrolyse enzymatique

Une fois le prétraitement effectué, les polysaccharides deviennent accessibles et une phase d'hydrolyse est nécessaire pour libérer les sucres fermentescibles.

Cette hydrolyse peut se faire de deux manières, soit une hydrolyse acide dans des conditions drastiques (100-250°C pH 1,5-2,2), soit une hydrolyse enzymatique dans des conditions plus neutres (50°C et pH5,0).

La condition d'hydrolyse acide entraîne une augmentation de l'impact carbone du procédé en raison de la température élevée et de l'utilisation de produits chimiques en quantité. De plus, ces paramètres d'hydrolyse vont entraîner la formation de composés inhibiteurs de la fermentation, principalement du HMF et du furfural, qu'il faudra éliminer pour pouvoir mener à bien la fermentation des sucres.

C'est pour cela que la voie enzymatique est privilégiée.

2.5.1. Enzymes et mécanismes d'action

L'hydrolyse des polysaccharides de la biomasse lignocellulosique se fait par le biais d'enzymes produites par des microorganismes xylophages : champignons et bactéries (Juturu & Wu, 2014), qui se trouvent à l'état naturel soit libres, soit dans l'appareil digestif de certains animaux.

Ces hydrolases, capables de couper des liaisons covalentes à l'aide d'une molécule d'eau sont en général composées d'un site de reconnaissance de molécule cible (CBM : Carbohydrate Binding Module) qui va permettre la spécificité de la réaction (Boraston et al., 2004) et d'un site catalytique qui va permettre la réaction enzymatique. (Suurnäkki et al., 2000)

2.5.1.1. Cellulases

Les cellulases, enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, sont principalement produites par des champignons, notamment *Trichoderma reesei*, un champignon filamenteux. C'est un des microorganismes les plus étudiés de par sa capacité à sécréter des enzymes thermophiles pouvant dégrader la cellulose (Bischof et al., 2016).

Une dégradation complète va nécessiter l'action synergique de trois types de cellulases :

- Les endoglucanases : Celles-ci vont couper aléatoirement les chaînes de cellulose au niveau des zones amorphes. Il va en résulter une diminution du degré de polymérisation. En créant de nouveaux bouts de chaînes, elles vont ainsi préparer le terrain pour les cellobiohydrolases (Payne et al., 2015)
- Les exoglucanases ou cellobiohydrolases vont progresser le long des extrémités libres des chaînes de cellulose et vont libérer du cellobiose (diholoside de Glucose $\beta(1\rightarrow4)$) (Sethi et al., 2013). Il en existe deux types :
 - CBHI qui va agir sur les terminaisons réductrices
 - CBHII qui va agir sur les terminaisons non réductrices
- Les β -glucosidases qui vont hydrolyser les diholosides de cellobiose en glucose. (Juturu & Wu, 2014)

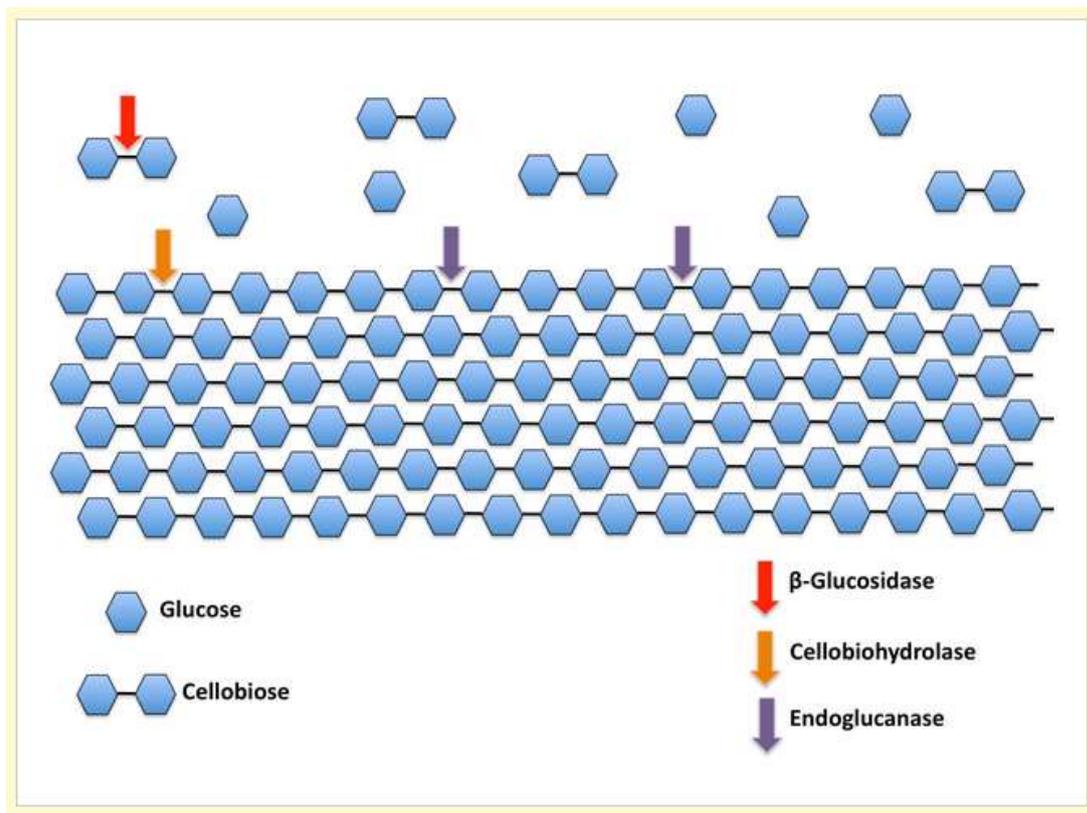


Figure 19. Vue schématique de la dégradation de la cellulose. Les endoglucanases hydrolisent les liaisons de la cellulose en interne, les cellobiohydrolases clivent les unités de cellobiose à l'extrémité des chaînes polysaccharidiques. Finalement les unités de cellobiose libérées sont hydrolysées par les β -Glucosidases en glucose.

2.5.1.2. Hémicellulases

L'organisation et la variabilité structurale des hémicelluloses imposent l'action combinée de nombreuses enzymes pour permettre leur dégradation complète. Lors d'un prétraitement alcalin, comme c'est le cas dans notre projet, ces enzymes s'avèrent essentielles car ce prétraitement ne permet pas de dépolymériser totalement les hémicelluloses.

Ces enzymes sont nombreuses mais vont agir grâce à un fonctionnement similaire aux cellulases, certaines enzymes vont agir directement à l'intérieur des chaînes (endoenzymes) et d'autres vont « grignoter », à partir des extrémités, des polysaccharides.

On trouve donc des hémicellulases très variées, Xylanase, Xylosidases, Arabinofuranosidases qui vont agir sur les arabinoxylanes très présentes chez les graminées et le bois de feuillus.

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

- Les endo- β -xylanases vont hydrolyser les xylanes au niveau de liaisons β -1,4, permettant la création de xylooligomères.
- Les exo- β -xylosidases vont hydrolyser ces xylooligomères en unités xyloses simples.
- Les endo- β -mannanases vont hydrolyser les hémicelluloses à base de mannane libérer des mannooligomères, qui seront par la suite hydrolysés en mannose par des β -mannosidases.
- Les α -arabinofuranosidases et α -arabinanases vont hydrolyser les hémicelluloses contenant des groupes arabinofuranosyles.
- Les α -glucuronidases vont couper les liaisons α -1,2-glycosidique qui relie des xylooligomères et l'acide 4-O-méthylglucuronique.
- Les acétyl-xylane estérases vont enlever les substitutions acétyles des xyloses
- Les féruloyl estérases vont couper les liaisons formées entre l'acide férulique et l'arabinose.

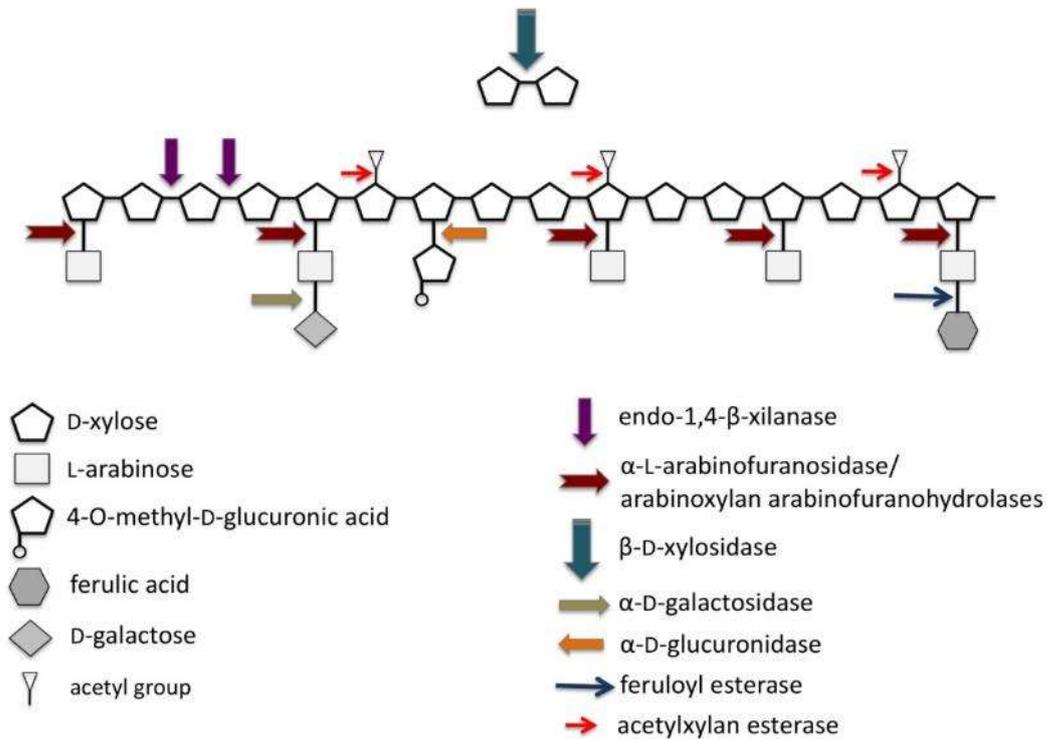


Figure 20. Vue schématique de la dégradation des hémicelluloses. (de Souza, 2013)

2.6. Facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique

En premier lieu il est important de noter le rôle de la température et du pH dans l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. Les cellulases ont une température optimale de fonctionnement aux alentours de 50°C avec un pH optimal aux alentours de 5.

On peut observer une perte d'activité catalytique non réversible lorsque la température dépasse les 50°C. Les β -glucosidases sont-elles, stables jusqu'à 60°C environ.

Si la température et le pH sont stables et constants, on observera quand même une forte diminution de la vitesse de réaction au cours de l'hydrolyse. Plusieurs facteurs vont entrer en jeu.

- Il est clairement établi que la plupart des enzymes vont subir une inhibition par les produits de leur réaction. Par exemple, il a été démontré un rôle important de la β -glucosidase dans l'hydrolyse de la cellulose. La présence de celle-ci en quantité va en effet permettre de maximiser le travail des cellobiohydrolases en diminuant la quantité de cellobiose

présente. Une des solutions pour résoudre ce problème se trouve probablement dans l'adaptation de conduite du procédé. Il a en effet été démontré que les procédés en SSF (Simultaneous saccharification and fermentation) ou SSCF (Simultaneous saccharification and cofermentation) entraînent une amélioration des rendements d'hydrolyse en permettant aux microorganismes de consommer directement les produits de la réaction enzymatique, réduisant considérablement leur inhibition de la réaction d'hydrolyse.

- La présence de lignines est aussi un facteur limitant. Celles-ci vont en effet constituer une barrière physique contre les attaques d'enzymes en créant un encombrement stérique empêchant l'accès aux fibres. (Donohoe & Resch, 2015)
- Les lignines vont aussi adsorber (de manière réversible ou non réversible) une quantité non négligeable d'enzymes ce qui va réduire la concentration en enzymes disponibles et donc limiter l'hydrolyse. Cette adsorption est principalement due à des interactions hydrophobes ou électrostatiques entre les lignines et les enzymes. (Zheng & Rehmann, 2014)
- Les hémicelluloses vont, comme les lignines, avoir un effet de barrière de protection pour les cellulases.
- Le degré de cristallisation et le degré de polymérisation des chaînes de polysaccharides vont aussi avoir un effet important sur l'efficacité de l'hydrolyse. (Zhao et al., 2012). La taille des pores permettant un accès aux fibres de cellulose va être un paramètre essentiel à un bon rendement d'hydrolyse. La taille des pores de la paroi cellulaire végétale est d'environ 5-10nm(CARPITA et al., 1979). Pour permettre un accès optimal des enzymes aux fibres, la taille des pores doit être de 50 à 100nm (Davidson et al., 2004)

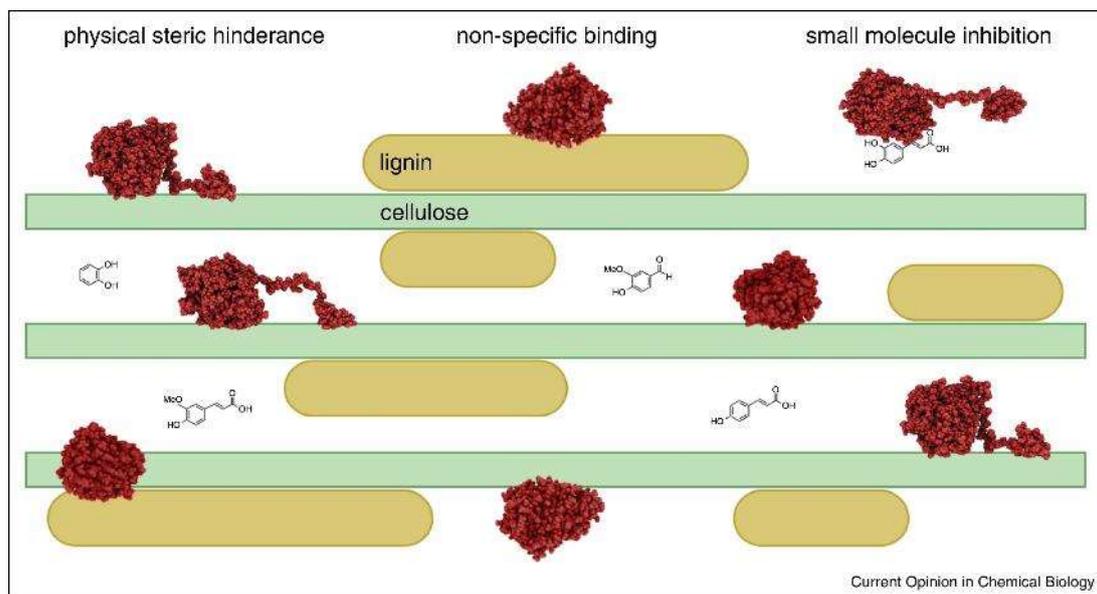


Figure 21 Interférences induites par la présence de lignine. En limitant l'accès au cellulase par encombrement stérique (rouge), la lignine (jaune) va induire une diminution des performances. Les lignines peuvent aussi attirer et adsorber les cellulases, diminuant ainsi leurs concentrations « actives ». Enfin on peut aussi observer une inhibition spécifique par de petites molécules issues de la déconstruction des lignines (acide vanillique, vanillin, pyrocatechol, acide ferulique et caféique...)(Donohoe & Resch, 2015)

Pour toutes ces raisons, un prétraitement efficace va être essentiel pour l'obtention d'un bon rendement d'hydrolyse.

Un prétraitement (chimique, thermique ou physique) entraînant une déstructuration des fibres, une élimination de la lignine et des hémicelluloses, un degré de polymérisation et de cristallisation plus faible et une forte augmentation de la taille des pores d'accès va donc permettre d'augmenter de manière radicale les performances du procédé. (Zhao et al., 2012)

2.6.1. Hydrolyse enzymatique à haute consistance

Une des conditions nécessaires à une distillation énergétiquement efficace et économiquement viable, est une concentration d'éthanol supérieur à 4% (m/m) (Zacchi & Axelsson, 1989). Pour cela, au vu de la concentration en sucres des différentes biomasses lignocellulosiques ainsi que des rendements enzymatiques

obtenus, il apparaît essentiel de travailler en condition de haute teneur en matière sèche (supérieure à 15%).

Cela permet aussi de réduire grandement la taille des bioréacteurs utilisés.

D'un autre côté, il a été démontré que l'hydrolyse en haute teneur en matière sèche pouvait être délétère au bon fonctionnement des enzymes. Weiss et al., 2019, ont démontré que les interactions entre l'eau libre et la biomasse pouvaient négativement impacter le rendement global d'une hydrolyse enzymatique.

De plus, les hautes concentrations en matières, vont favoriser l'accumulation d'inhibiteurs de l'hydrolyse ou de la fermentation présents dans la biomasse traitée.

Enfin la modification des caractéristiques rhéologiques du milieu va aussi venir perturber le procédé. De par notre expérience, la viscosité initiale de ces milieux complexes est très élevée, cela peut entraîner de nombreuses difficultés pour produire un mélange homogène, entraînant des retards partiels de l'hydrolyse ou de la fermentation et une hétérogénéité générale qui peut compromettre les échantillonnages et les mesures en découlant.

Pour résoudre ces problèmes, des études sont en cours pour démontrer le rôle bénéfique d'une conduite en Fed batch, qui permet de maintenir un niveau d'eau disponible élevé, assurant une diffusion efficace d'enzymes et de produits en améliorant grandement la liquéfaction du substrat.(Modenbach & Nokes, 2013) (Fockink et al., 2016).

2.7. Procédé

De nombreuses conduites de procédé ont été testées et mises au point ces dernières années dans le but d'améliorer la production d'éthanol. Nous allons, dans ce manuscrit, essayer d'en décrire la plus grande majorité, sans toutefois être exhaustif.

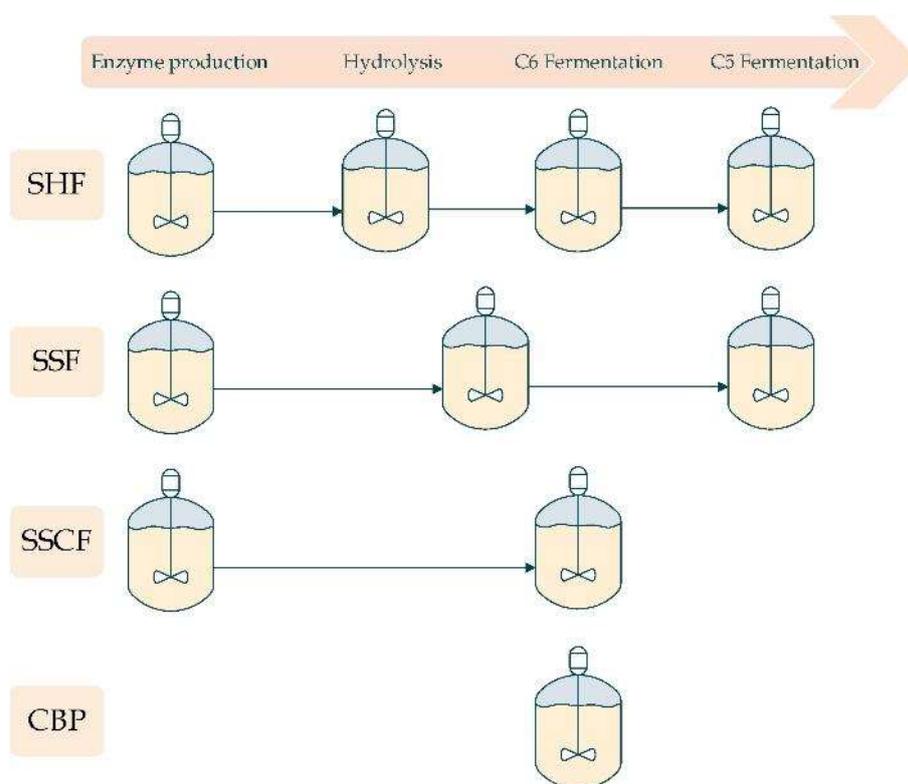


Figure 22. Utilisation de bioréacteurs dans les différents procédés existant actuellement (Toor et al., 2020)

2.7.1. Separate hydrolysis and fermentation (SHF)

La conduite la plus simple est une conduite en batch qui se fait sous forme séquentielle, chaque étape étant effectuée dans un réacteur différent.

Dans le procédé SHF, la biomasse prétraitée va d'abord être sujette à une hydrolyse enzymatique pour dégrader les sucres complexes et obtenir un moût composé de sucres simples facilement fermentescibles.

Ce moût sucré est ensuite transféré dans un autre réacteur où va avoir lieu la fermentation qui va transformer les sucres simples en éthanol.

L'avantage de ce procédé est qu'il est possible d'effectuer chaque étape à des températures optimales, en général 50°C pour la partie saccharification et 30°C pour la partie fermentation. (Toor et al., 2020)

D'un autre côté, ce procédé va nécessiter plus de réacteurs, et plus de temps. De plus, l'hydrolyse enzymatique va rapidement être sujette à une inhibition par le produit lorsque les sucres simples vont s'accumuler dans le moût. (Tavva et al., 2016) (Söderström et al., 2005)

2.7.2. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

La méthode de Saccharification et fermentation simultanée (SSF) est une méthode récente dans laquelle la biomasse prétraitée va subir l'hydrolyse enzymatique et la fermentation de manière concomitante et dans un seul et même bioréacteur à une température adéquate pour les deux processus, en général 30°C. (Q. Zhang et al., 2016) (Kumagai et al., 2014)

Les avantages premiers de cette technique sont (da Costa Nogueira et al., n.d.)(Siriwong et al., 2019) que les enzymes vont pouvoir travailler sans jamais subir d'inhibition par leurs produit, (Sakimoto Kouki A4 - Kanna, Machi A4 - Matsumura, Yukihiro, 2017) celui-ci étant directement consommé par les levures. Avec cette technique, on observe une meilleure production d'éthanol dans cette configuration de procédé malgré le fait que les enzymes ne travaillent pas à leur température optimale (50°C).

Cette méthode permet aussi l'utilisation d'un seul et unique bioréacteur ce qui peut être un réel avantage, en réduisant grandement les coûts, la place et le temps lors d'un procédé à l'échelle industrielle.

2.7.3. Simultaneous saccharification and Co-fermentation (SSCF)

Variante de la conduite en SSF, la conduite en SSCF va utiliser soit un consortium de microorganismes consommant hexose et pentose, soit un microorganisme, modifié génétiquement ou non, capable de consommer ces deux types de sucres. Cela permet d'effectuer toutes les fermentations et saccharification dans le même bioréacteur et d'atteindre de meilleurs niveaux de production d'éthanol qu'en SSF simple.

2.7.4. Pré hydrolysis and Simultaneous saccharification and Co-fermentation (PH-SSCF)

Variante de la conduite en SSCF, l'introduction des levures co-consommant C5 et C6 est précédée d'une phase de pré-hydrolyse à la température optimale de fonctionnement des enzymes (50°C). Cette phase de pré-hydrolyse peut être plus

ou moins longue (de quelques heures à 48h). Cette variante permet de liquéfier le substrat avant introduction des levures, limitant le stress hydrique et les problématiques de mélange. Cette technique permet aussi de démarrer la fermentation avec une quantité de sucre assez élevée, tout en conservant les avantages de la SSCF, c'est-à-dire l'utilisation d'un seul et même réacteur et une limitation de l'inhibition des enzymes par leurs produits.

2.7.5. Preselective saccharification and fermentation

Dans l'optique d'atteindre des concentrations en éthanol élevées, nous avons vu qu'il était important de consommer aussi les pentoses (xylose) qui sont présents dans les biomasses cellulosiques en quantité non négligeable. (Romaní et al., 2012). Cela est possible lors d'un procédé en SHF ou SSF, mais l'un des problèmes rencontrés va être une inhibition de la consommation de xylose à cause de la forte concentration en glucose. En effet, le xylose va être transporté dans *S. cerevisiae* par le même transporteur membranaire que celui du glucose mais avec une affinité très faible. Le xylose sera donc consommé par la levure uniquement lorsque la concentration de glucose sera faible, ce qui arrivera en fin de fermentation, avec une forte concentration en éthanol qui risquera d'inhiber la fermentation et donc la consommation du xylose. (Stenberg, 1999) (Hara et al., 2017)

Pour pallier cette éventualité, certaines équipes ont mis au point une conduite de procédé qui permet de conserver une balance xylose/glucose en faveur du xylose dans les premiers temps du procédé afin de favoriser la consommation du xylose (Olofsson et al., 2010)(Hodge et al., 2008)

Le problème peut être une mauvaise efficacité de la réaction d'hydrolyse en haute teneur à matière sèche à cause de la mauvaise liquéfaction du mélange lorsque celui-ci se retrouve uniquement en présence d'hémicellulases. Ce procédé n'est donc valable que pour certains prétraitements. (Patel et al., 2005)

2.7.6. Direct microbial conversion/consolidated bioprocessing

Comme nous l'avons précédemment vu, la déconstruction de la structure lignocellulosique est un processus complexe comprenant de nombreuses étapes. Le coût du substrat, de son prétraitement et des enzymes nécessaires à l'hydrolyse enzymatique représente environ 2/3 des coûts de production. La majorité étant due à l'utilisation des enzymes. (Himmel et al., 2007).

Dans l'optique de réduire ces coûts, il a été imaginé la création de microorganismes fermentaires capables de produire directement un complexe cellulolytique et hémicellulolytique et donc d'effectuer les étapes de saccharification et de fermentation de manière concomitante sans avoir recours à des enzymes exogènes. Ce type de procédé se prénomme CBP pour Consolidated Bio Processing. (Parisutham et al., 2014)

Au cours des dernières années, de nombreux microorganismes, sauvages ou génétiquement modifiés, bactéries, champignons et levures ont été employés en CBP avec des résultats encourageants. (Schuster & Chinn, 2013)

Malgré cela, cette technique n'en est encore qu'à ses balbutiements, et la route risque d'être encore longue avant de voir arriver sur le marché un microorganisme qui puisse être efficace dans les 3 étapes que sont l'hydrolyse enzymatique et la fermentation des hexoses et celle des pentoses.(Olson et al., 2012)

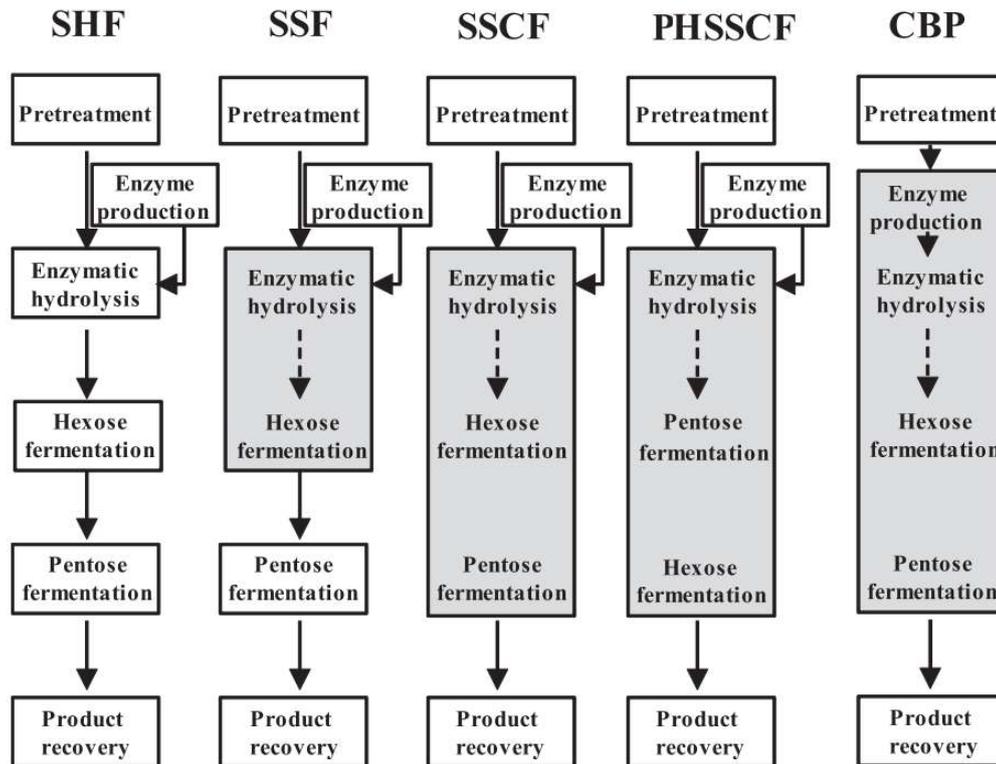


Figure 23. Schéma récapitulatif des différents procédés et de leurs étapes. (Parisutham et al., 2014)

2.7.7. Fed batch

Les précédents bioprocédés présentés sont dits en batch. Les levures sont ajoutées à un moût dont la quantité est définie et la fermentation se déroulera dans ce volume. A l'inverse, le procédé Fed batch va permettre de faire varier ce volume en amenant graduellement de plus en plus de biomasse.

Comme nous l'avons vu, les différents traitements peuvent être créateurs d'inhibiteurs, présents en plus ou moins grande quantité. En vue d'obtenir une production d'éthanol efficace et une concentration finale élevée, il apparaît nécessaire d'augmenter la teneur en matières sèches dans le moût, ce qui va avoir pour effet d'augmenter la concentration de ces inhibiteurs mais aussi de poser des problèmes de liquéfaction de la matière.

La conduite en Fed batch peut permettre de parer à ces inconvénients. En apportant petit à petit la biomasse prétraitée les concentrations en inhibiteurs restent limitées au début de la fermentation, laissant le temps aux microorganismes de se reproduire et de proliférer dans le milieu. (Moreno, Tomás-Pejó, et al., 2013)

De plus, cette conduite permet aussi de viser des teneurs en matière sèche très élevées (30% m/m) sans avoir de problèmes de solidification du milieu et donc des soucis de stress osmotique mais aussi de mélange et d'échantillonnage.

2.8. Microorganisme

La fermentation alcoolique est un processus biologique par lequel des sucres sont transformés en éthanol et CO₂.

On peut trouver dans la littérature de nombreuses revues sur la production d'éthanol par de nombreux microorganismes, levures, bactéries et champignons. (Fig10)

Historiquement, le microorganisme le plus utilisé est la levure. Parmi les levures, *Saccharomyces cerevisiae*, a les faveurs de bon nombre d'industries. Elle permet en effet de produire de grande quantité d'éthanol, jusqu'à 18%, elle est plutôt robuste, pousse sur des sucres simples comme le glucose ou sur du saccharose, et est reconnue sûre pour la consommation humaine (Generally Recognized As Safe).

Zymomonas mobilis est une bactérie à Gram négative qui possède de nombreux atouts pour la production d'éthanol. En effet ce microorganisme peut tolérer plus de 120g/L d'éthanol, il peut atteindre un meilleur rendement éthanol (5-10% plus d'éthanol produit par mole de glucose) et a une meilleure productivité que *Saccharomyces*. Malheureusement cet organisme ne peut fermenter que le glucose, fructose et saccharose.

Escherichia coli, lorsque elle est modifiée, semble elle aussi pouvoir être une cible de choix pour la production d'éthanol, elle peut être capable de fermenter un spectre large de sucres, et son utilisation en milieu industriel est très bien documentée. Ses désavantages sont la nécessité d'une plage de pH neutre et peu étendue (6 à 8pH), des cultures moins robustes que *Saccharomyces* et une appréhension du grand public vis-à-vis de son utilisation.

D'autres organismes peuvent être aussi utilisés de manière anaérobie, on peut citer les bactéries thermophiles comme *Clostridium thermocellum* (Ingram et al. 1987), ainsi que les champignons filamenteux comme *Monilia* sp. (Saddler and Chan 1982), *Neurospora crassa* (Gong et al. 1981), *Neurospora* sp. (Yamauchi et al. 1989), *Zygosaccharomyces rouxii* (Pastore et al. 1994), *Aspergillus* sp. (Sugawara et al. 1994), *Trichoderma viride* (Ito et al. 1990), and *Paecilomyces* sp. (Gervais and Sarrette 1990). Leurs utilisations restent tout de même limitées du fait que leur

fermentation peut être assez lente (3-12 jours) avec un rendement plus faible que celui de *Saccharomyces*.

Tableau 1. Liste des espèces de levure capable de produire de l'éthanol

Table 1 Yeast species which produce ethanol as the main fermentation product

Strain-species	Temperature (°C)	pH value	Carbon source and concentration (g/l)	Nitrogen source and concentration (g/l)	Incubation time (h)	Concentration of ethanol produced (g/l)	References
27817- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	5.5	Glucose (50-200)	Peptone (2) and ammonium sulfate (4)	18-94	5.1-91.8	Vallet et al. 1996
t-041- <i>S. cerevisiae</i>	30 or 35	-	Sucrose (100)	Urea (1) or ammonium sulfate (1-2)	24	25-50	Leticia et al. 1997
181- <i>S. cerevisiae</i> (aerobic)	27	6.0	Glucose (10)	Peptone (5.0)	40-160	-	Todor and Tsonka 2002
UO-1- <i>S. cerevisiae</i> (aerobic)	30	5.0	Sucrose (20)	Ammonium sulfate (1)	60-96	-	Camacho-Ruiz et al. 2003
V5- <i>S. cerevisiae</i>	24	-	Glucose (250)	-	36	-	Virginie et al. 2001
ATCC 24860- <i>S. cerevisiae</i>	30	4.5	Molasses (1.6-5.0)	Ammonium sulfate (0.72-2.0)	24	5-18.4	Ergun and Mufu 2000
Bakers' yeast- <i>S. cerevisiae</i>	30	4.5	Sugar (150-300)	-	192	53 (max)	Roukas 1996
Bakers' yeast- <i>S. cerevisiae</i>	28	5.0	Sucrose (220)	Peptone(5) and ammonium dihydrogen phosphate (1.5)	96	96.71	Caylak and Vardar 1996
Fiso- <i>S. cerevisiae</i>	30	5.0	Galactose (20-150)	Peptone, ammonium sulfate and casamino acid (10)	60	4.8-40	da Cruz et al. 2003
A3- <i>S. cerevisiae</i>	30	5.0	Galactose (20-150)	Peptone, ammonium sulfate and casamino acid (10)	60	4.8-36.8	da Cruz et al. 2003
L52- <i>S. cerevisiae</i>	30	5.0	Galactose (20-150)	Peptone, ammonium sulfate and casamino acid (10)	60	2.4-32.0	da Cruz et al. 2003
GCB-K5- <i>S. cerevisiae</i>	30	6.0	Sucrose (30)	Peptone (5)	72	27	Kiran et al. 2003
GCA-II- <i>S. cerevisiae</i>	30	6.0	Sucrose (30)	Peptone (5)	72	42	Kiran et al. 2003
KR1a- <i>S. cerevisiae</i>	30	6.0	Sucrose (30)	Peptone (5)	72	22.5	Kiran et al. 2003
CMI237- <i>S. cerevisiae</i>	30	4.5	Sugar (160)	Ammonium sulfate (0.5)	30	70 (max)	Navarro et al. 2000
2.399- <i>S. cerevisiae</i>	30	5.5	Glucose (31.6)	Urea (6.4)	30	13.7 (max)	Yu and Zhang 2004
24860- <i>S. cerevisiae</i>	-	-	Glucose (150)	Ammonium dihydrogen phosphate (2.25)	27	48 (max)	Ghasem et al. 2004
27774- <i>Kluyveromyces fragilis</i>	30	5.5	Glucose (20-120)	Peptone (2) and ammonium sulfate (4)	18-94	48.96 (max)	Vallet et al. 1996
30017- <i>K. fragilis</i>	30	5.5	Glucose (20-120)	Peptone (2) and ammonium sulfate (4)	18-94	48.96 (max)	Vallet et al. 1996
30016- <i>Kluyveromyces maridanus</i>	30	5.5	Glucose (100)	Peptone (2) and ammonium sulfate (4)	18-94	44.4 (max)	Vallet et al. 1996
30091- <i>Candida utilis</i>	30	5.5	Glucose (100)	Peptone (2) and ammonium sulfate (4)	18-94	44.4 (max)	Vallet et al. 1996
ATCC-32691 <i>Pachysolen tannophilus</i>	30	4.5	Glucose (0-25) and xylose (0-25)	Peptone (3.6) and ammonium sulfate (3)	100	7.8 (max)	Sanchez et al. 1999

Tableau 2. Liste des bactéries capables de produire de l'éthanol et leur rendement

Mesophilic organisms	Mmol ethanol produced per mmol glucose metabolized	References
<i>Clostridium sporogenes</i>	up to 4.15 ^a	Miyamoto 1997
<i>Clostridium indoli</i> (pathogenic)	1.96 ^a	Miyamoto 1997
<i>Clostridium sphenoides</i>	1.8 ^a (1.8) ^b	Miyamoto 1997
<i>Clostridium sordelli</i> (pathogenic)	1.7	Miyamoto 1997
<i>Zymomonas mobilis</i> (syn. <i>Anaerobica</i>)	1.9	Miyamoto 1997
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceas</i>	1.7	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta aurantia</i>	1.5 (0.8)	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	0.84 (1.46)	Miyamoto 1997
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1.1 (1.4)	Miyamoto 1997
<i>Erwinia amylovora</i>	1.2	Miyamoto 1997
<i>Escherichia coli</i> KO11	0.7–0.1	Dien et al. 2003; Matthew et al. 2005
<i>Escherichia coli</i> LY01	40–50 g ethanol produced/l	Dien et al. 2003
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.1	Miyamoto 1997
<i>Streptococcus lactis</i>	1.0	Miyamoto 1997
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.94–0.98	Matthew et al. 2005
<i>Klebsiella aerogenes</i>	24 g ethanol produced/l	Ingram et al. 1998
<i>Mucor</i> sp. M105	–	Ingram et al. 1998
<i>Fusarium</i> sp. F5	–	Ingram et al. 1998

2.8.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est un eucaryote unicellulaire appartenant au règne des champignons et à la famille des saccharomycètes. Cette espèce appartient à l'embranchement des ascomycètes qui sont caractérisés par la formation de spores.

S. cerevisiae est une levure qui est utilisée par les hommes depuis plusieurs milliers d'années, on la trouve à l'état naturel sur des exsudats d'arbres, les insectes et principalement sur les fruits fermentés ou en cours de fermentation. C'est un microorganisme très robuste qui peut supporter de nombreuses conditions de

pH et de températures et dont le temps de doublement en conditions favorables se trouve aux alentours de 1,25-2h.

L'homme l'utilise principalement pour la création d'un nombre important de produits de consommation fermentés, panification, vinification, brassage de bière...

S. cerevisiae prend la forme d'une cellule isolée, ovoïde ou arrondie. Sa taille moyenne est d'environ 6 à 12 micromètres.

C'est un organisme modèle en génétique et en biologie cellulaire. Son génome fut le premier à être intégralement séquencé en 1996, celui-ci se compose d'un ADN linéaire double brin de 12 millions de paires de bases qui forment 6275 gènes répartis sur 16 chromosomes (Goffeau et al., 1996). Ces chromosomes peuvent être présents en un seul ou plusieurs exemplaires qui vont définir la ploïdie des cellules. (Les levures haploïdes ne possèdent qu'un exemplaire de chaque chromosome, les diploïdes une paire de chaque chromosome.)

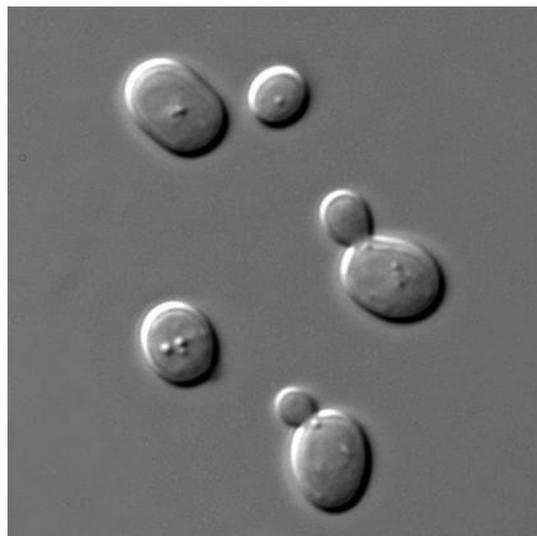


Figure 24. *S. cerevisiae* vue au microscope à contraste de phase.

2.8.1.1. Cycle biologique

S. cerevisiae présente un cycle biologique dit haplodiplophasique, elle peut donc se développer de manière haploïde ou diploïde, par voie sexuée ou asexuée.

Elle est ainsi capable de se reproduire par voie asexuée, par bourgeonnement. Cette multiplication asexuée permet une colonisation très rapide des milieux de vie en induisant la création et la production très rapide d'un grand nombre de

clones par mitose. Elle est de plus énergétiquement favorable à l'organisme et se déroule principalement en milieu favorable.

Lorsque les conditions du milieu sont plus difficiles *S. cerevisiae* va procéder à une reproduction sexuée en effectuant une méiose pour produire des spores formées d'individus haploïdes a et α qui démontrent des aspects primitifs de différenciation sexuelle. Cette reproduction sexuée permet principalement de mieux conserver le patrimoine génétique des levures en limitant le nombre de mutations pouvant être délétères.

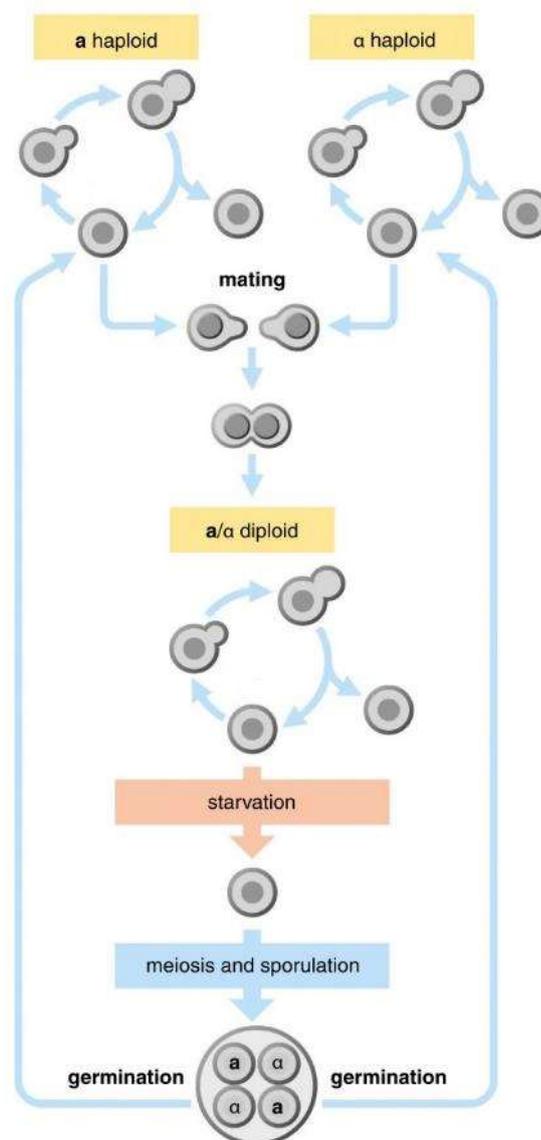


Figure 25. Cycle de vie de *S. Cerevisiae* (Sun & Heitman, 2011)

2.8.1.2. Métabolisme sucres et production éthanol

Le glucose va être transporté par diffusion facilitée dans le cytosol grâce aux transporteurs Hxt1-17 et Gal2. (Maier et al., 2002)

Comme la plupart des autres microorganismes, *S. cerevisiae* métabolise le glucose au travers du cycle de Embden–Meyerhof (EM).

S. cerevisiae est capable de vivre dans de nombreux milieux et sur de nombreux substrats. Selon les conditions environnementales elle va adapter son métabolisme entre :

Une voie aérobie classique, où le glucose va être transformé en CO₂ et ATP à l'aide de l'oxygène (respiration).

Cette voie oxydative, est privilégiée en présence d'oxygène et lorsque la concentration en glucose reste inférieure à 150mg/L (Verduyn et al., 1984). Le glucose va permettre la maintenance et la croissance cellulaire en étant dégradé en H₂O et CO₂ avec production d'ATP par les voies de la glycolyse, des pentoses phosphates, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. (Fig. 26).

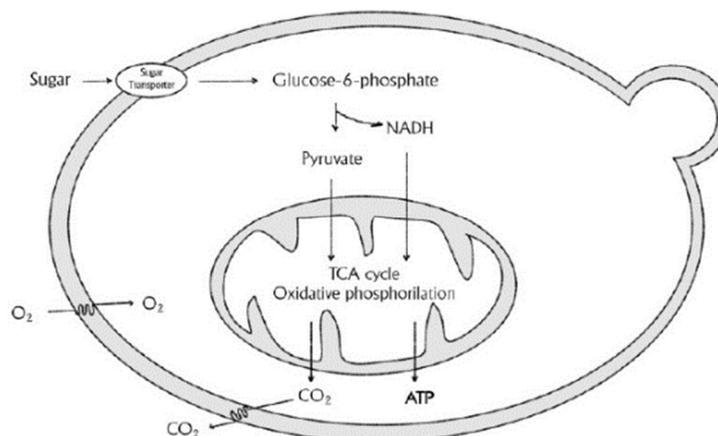


Figure 26. Respiration cellulaire chez *S. Cerevisiae* (Faria-Oliveira et al., 2013)

En absence d'oxygène, une voie anaérobie utilisant la fermentation alcoolique du glucose va se mettre en place. (Fig. 27) L'accepteur final d'électrons ne sera plus l'oxygène mais l'acétaldéhyde. Le glucose se voit transformé en pyruvate par la voie de la glycolyse, mais au lieu d'être dirigé vers le cycle de Krebs, il est transformé en éthanol et CO₂ par décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde puis réduction de l'acétaldéhyde en éthanol en utilisant la NADH,H⁺ en coenzyme. (Sonnleitner & Käppli, 1986)

Ce métabolisme fermentaire est beaucoup moins producteur d'énergie que le métabolisme oxydatif mais permet à *S. cerevisiae* de sécréter l'éthanol rendant ainsi

le milieu extérieur inadapté à la plupart des microorganismes, s'assurant ainsi une colonisation et une domination du milieu.

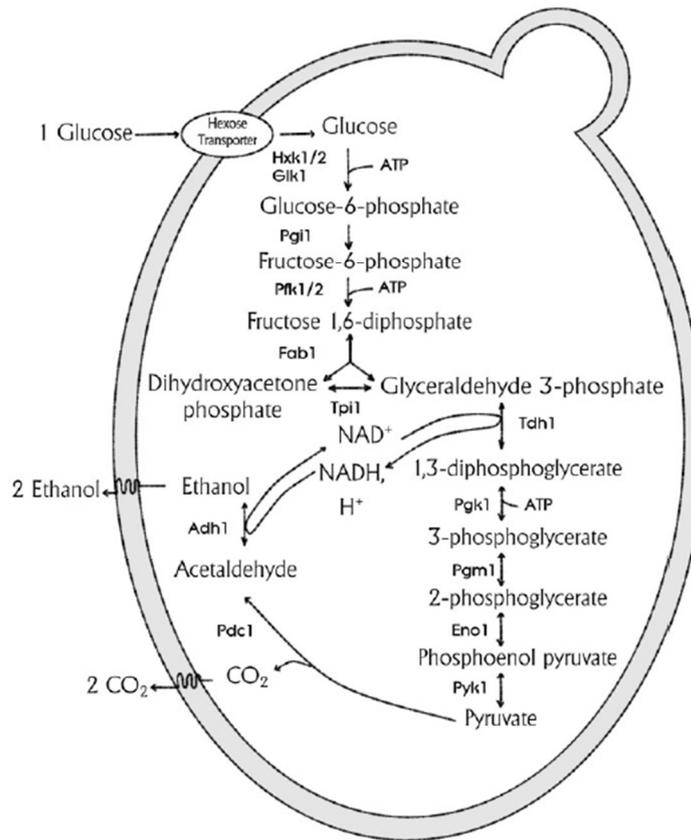


Figure 27. Fermentation Alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae*

Des métabolites secondaires comme le glycérol ou des acides organiques sont aussi produits lors de la fermentation alcoolique, le glycérol étant le coproduit majoritaire après l'éthanol. Son rôle est de maintenir une balance oxydoréductive de la cellule permettant la reoxydation du NADH cytosolique. Il joue aussi un rôle essentiel comme protecteur lors de stress osmotiques et thermiques. (Fig. 28)

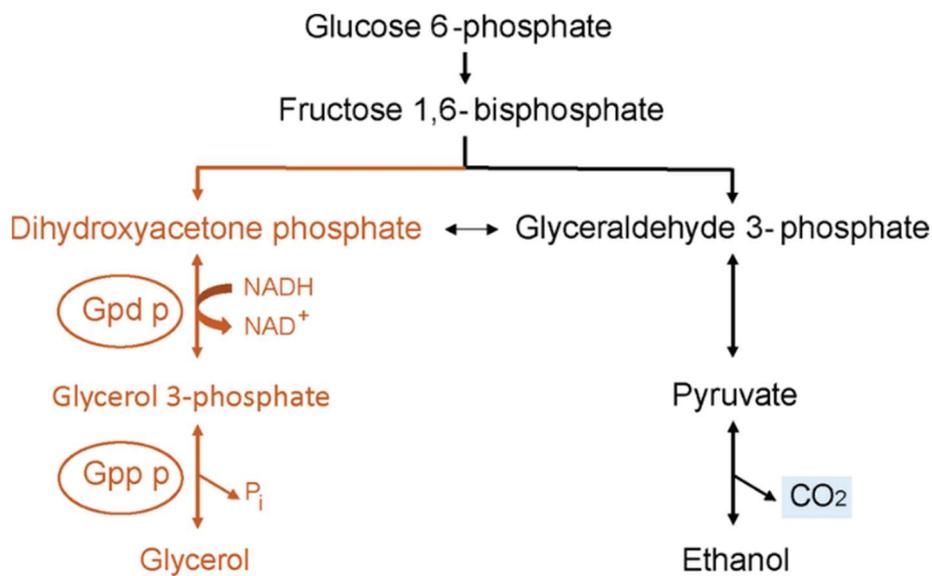


Figure 28. Biosynthèse du glycérol (Aslankoohi et al., 2015)

2.8.1.3. Facteurs influençant le rendement

Le principal stress rencontré par la levure au cours de la fermentation alcoolique est la présence d'éthanol. En effet, *S. cerevisiae* va être inhibée par sa propre production d'éthanol. Celui-ci va réduire à la fois le taux de croissance, la vitesse de fermentation et la viabilité cellulaire. La croissance cellulaire sera complètement arrêtée aux alentours de 90-100 gL⁻¹ d'éthanol selon les souches, même si la production d'éthanol peut continuer à se faire vers des valeurs plus élevées. (G. P. Casey & Ingledew, 1986).

D'autres paramètres environnementaux vont entraîner des stress au niveau cellulaire, les levures vont en premier lieu activer une réponse générale au stress : ESR pour « Environmental Stress Response ». Celle-ci va permettre la régulation différentielle d'environ 900 gènes. (Gasch et al., 2000).

Pour chaque paramètre environnemental modifié, des réponses spécifiques vont s'ajouter. (Oxydation, température, pression osmotique, pH...)

2.8.1.3.1. Température

Il existe un lien direct entre la température de fermentation et la vitesse de celle-ci, pour peu que cette température reste dans des valeurs acceptables pour *S. cerevisiae*, c'est-à-dire entre 10°C et jusqu'à 40°C.

La température va avoir une influence sur le taux de croissance, la vitesse de production d'éthanol, la production de CO₂, la viabilité cellulaire... (Aldiguiet et al., 2004)

2.8.1.3.2. PH

Le pH optimal pour la plupart des souches de *S. cerevisiae* se trouve aux alentours de 5-5,2 pH (Peña et al., 2015). La tolérance des différentes souches de *S. cerevisiae* reste tout de même assez large avec une survie entre 2.4 et 8.6. Cela est dû au fait que la membrane cellulaire est imperméable aux ions H⁺ et OH⁻. Le pH influence par contre fortement la production de glycérol et d'acides organiques

2.8.1.3.3. Variations de salinité et d'osmolarité

La levure *S. cerevisiae* est réputée robuste, elle peut survivre à de nombreux stress et notamment à de fortes quantités de sels extracellulaires.

Cette robustesse repose principalement sur des mécanismes de transports intramembranaire de différents ions. (Fig.29)

La régulation de ces transport permet le maintien intracellulaire d'un taux élevés de potassium et donc le maintien d'un potentiel membranaire.(Ariño et al., 2010)

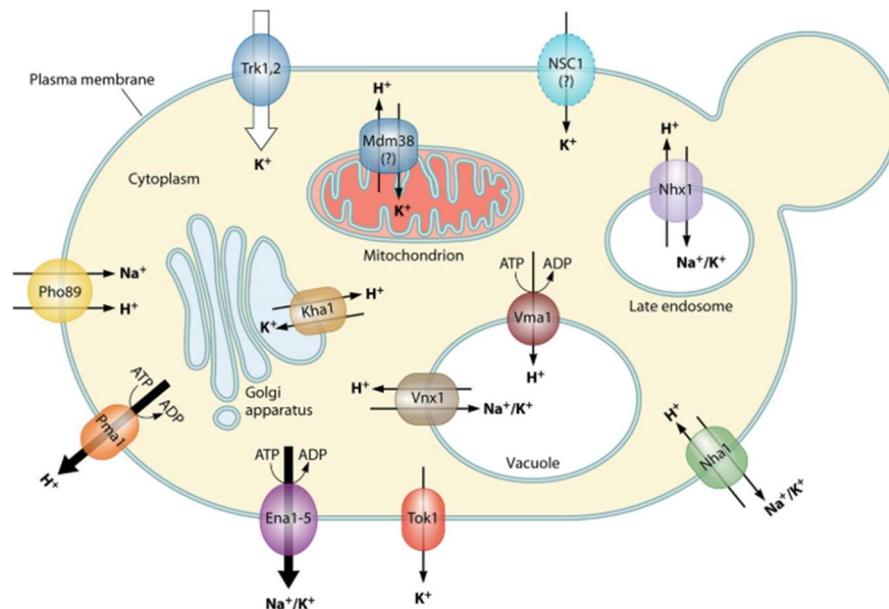


Figure 29. Les principaux transporteurs de cations, transmembranaire et intracellulaire chez la levure *S. cerevisiae*(Ariño et al., 2010)

De nombreuses études ont pu démontrer un effet inhibiteur des ions provenant de sels sur le taux de croissance de *S. cerevisiae*. (Bautista-Gallego et al., 2008)

Il est admis que l'effet inhibiteur provient principalement d'une demande énergétique élevée pour permettre la maintenance cellulaire et l'évacuation des cations hors de la cellule. Ce mécanisme de transport actif va permettre de réguler la concentration ionique intracellulaire et la maintenir à un niveau non toxique, mais cela va consommer les réserves d'ATP au détriment de la croissance cellulaire. (Maiorella et al., 1984)

Un fort stress osmotique, à l'instar d'autre stress environnemental, va de plus activer la voie HOG (High Osmolarity Glycerol) qui va permettre la redirection du métabolisme vers une production accrue de glycérol. Celui-ci va agir comme un osmolyte et permettre une régulation osmotique et un maintien d'une balance redox. (Hohmann, 2009)(Hohmann, 2002)

2.8.1.3.4. Présence d'inhibiteurs de la fermentation

Plusieurs composés inhibiteur du métabolisme de la levure ont été identifiés, ceux-ci proviennent des différentes molécules de la biomasse lignocellulosique et de leurs transformations sous l'effet des différents prétraitement appliqués: (Sreenath & Jeffries, 2000)

- Dérivés du Furan : Furfural et l'hydroxymethylfurfural (HMF)
- Acides faibles : acide acétique, levulinique ou formique
- Composés phénoliques

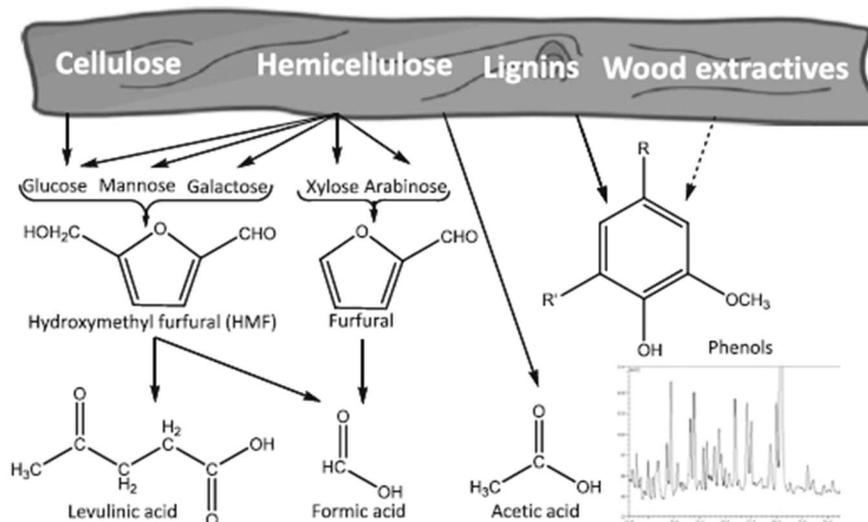


Figure 30. Formation des inhibiteurs lignocellulosiques (Jönsson et al., 2013)

Les dérivés du furan entraînent une diminution de la production en éthanol. (Almeida et al., 2007). Le furfural et l'HMF inhibent des enzymes du métabolisme microbien. Notamment l'alcool déshydrogénase (ADH), l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) et la pyruvate déshydrogénase (PDH), entraînant l'augmentation de la concentration d'acétaldéhyde intracellulaire. Celui-ci étant très toxique pour la levure, ses effets peuvent aller de la diminution du rendement éthanol jusqu'à la mort cellulaire. (Taherzadeh et al., 2000)

Les acides faibles vont diminuer le taux de croissance et la production de biomasse en perturbant le pH intracellulaire. Pour faire face à ces perturbations, *S. cerevisiae* va devoir augmenter les dépenses énergétiques nécessaires à la prise en charge de ces ions et au rétablissement d'un pH intracellulaire optimal, limitant temporairement la production de biomasse et la croissance cellulaire. (Ding et al., 2011)

Les composés phénoliques de leur côté provoquent une perméabilisation de la membrane cellulaire aux ions et à d'autres molécules, ce qui va fortement perturber le métabolisme cellulaire et entraîner une diminution du taux de croissance, du rendement d'éthanol et de sa production. (Adeboye et al., 2014)

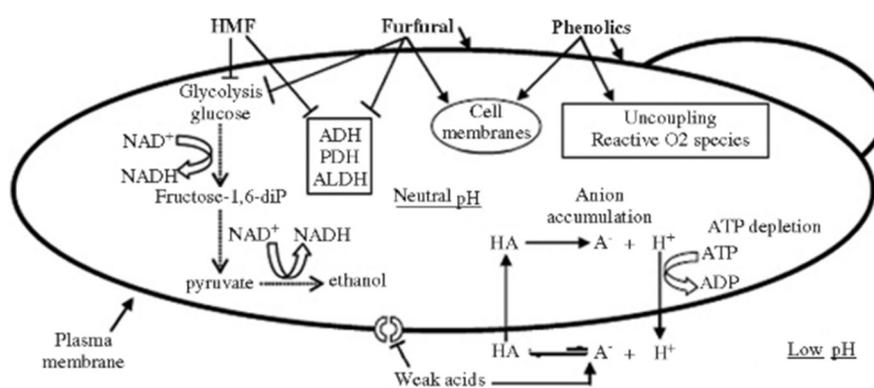


Figure 31. Vue schématique des mécanismes d'inhibition des furanes, acides faibles et phénols. (Almeida et al., 2007)

2.8.1.3.5. Consommations des pentoses, modification génétique

A l'état natif, *S. cerevisiae* n'est pas capable de consommer les pentoses. Pour résoudre ce problème, il a fallu se tourner vers l'utilisation d'ingénierie génétique. Des souches modifiées de *S. cerevisiae* existent déjà depuis plusieurs années, la plupart ont été développées pour améliorer la tolérance à différents stress et réduire les occurrences de situation inhibitrice. (Mohd Azhar et al., 2017)

En vue de consommer le xylose deux stratégies principales ont vu le jour (Laluce, Schenberg, Gallardo, Coradello, & Pombeiro-Sponchiado, 2012 :

- Les gènes de la Xylose reductase (XR) et la xylitol dehydrogenase (XDH) provenant de *Pichia stipitis* ont été introduits dans des souches de *S. cerevisiae*
- Les gènes de la xylose isomérase et de la xylulokinase provenant de certaines bactéries et champignons ont été introduits chez *S. cerevisiae*

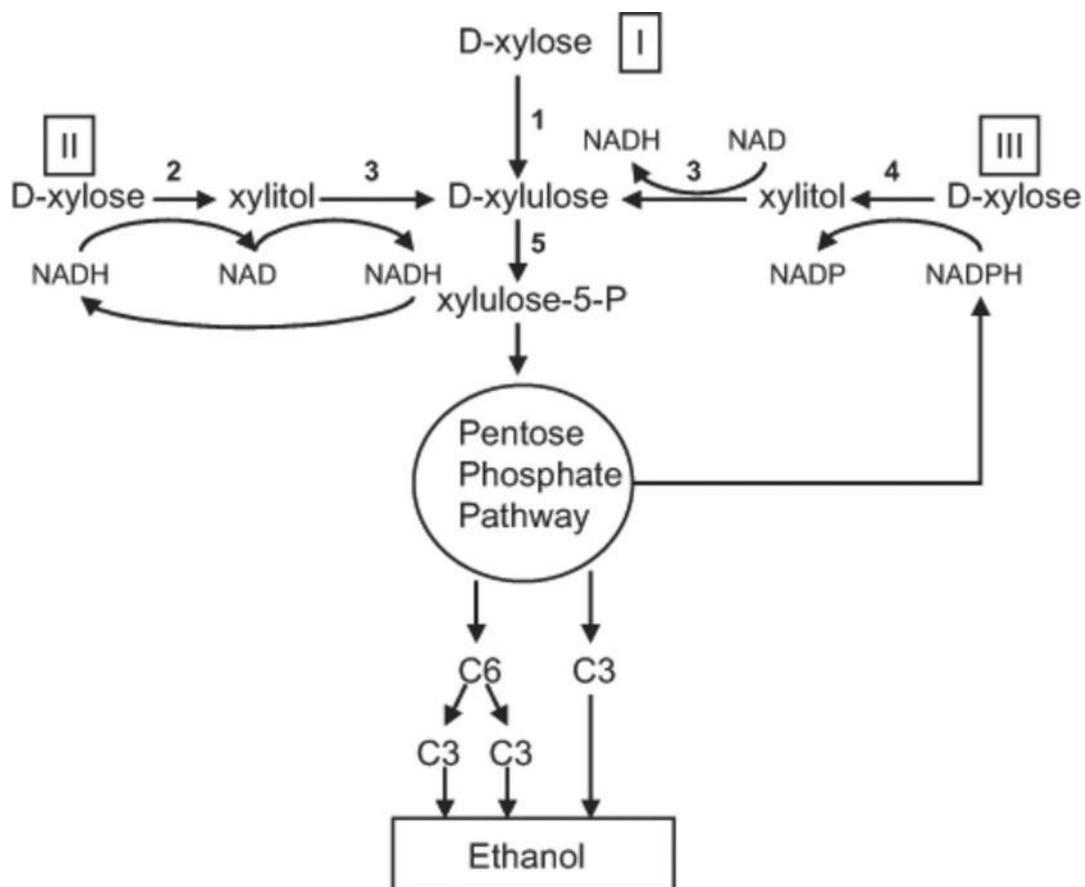


Figure 32. Conversion du xylose en éthanol via des voies métabolique dépendante(III) ou indépendante de cofacteurs (I-II) (Kuyper et al., 2003)

1. Xylose isomérase ; 2. NADH-linked xylose reductase; 3. xylitol dehydrogenase; 4. NADPH-linked xylose reductase; 5. xylulokinase.

2.8.1.3.6. Voie oxydo-reductase, Co facteurs dépendante (XR/XDH)

La voie métabolique de *Pichia stipitis* a été introduite chez *S. cerevisiae*, lui permettant d'exprimer la Xylose réductase ainsi que la Xylose déhydrogénase.

La plupart des constructions efficaces dans la littérature ajoutent aussi une surexpression de la protéine endogène Xylulokinase pour éviter un goulot d'étranglement de la voie métabolique et l'accumulation de xylulose qui pourraient diminuer le rendement de production d'éthanol.

Cette voie métabolique est caractérisée par la stricte nécessité de la présence de cofacteurs, La xylose réductase réduit le D-xylose en xylitol en utilisant un NADPH, le xylitol est ensuite oxydé en D-Xylulose par la xylitol dehydrogenase en utilisant du NAD. Le D-xylulose est ensuite phosphorylé par la xylulokinase en utilisant un ATP, produisant du D-xylulose-5-P qui peut intégrer la voie des pentoses phosphate.

Du fait de l'utilisation des différents cofacteurs de cette réaction et de leur disponibilité cellulaire, cette voie peut mener à une accumulation de xylitol, notamment si la régénération du NAD n'est pas optimale. Situation qui peut arriver lors d'une carence en oxygène.

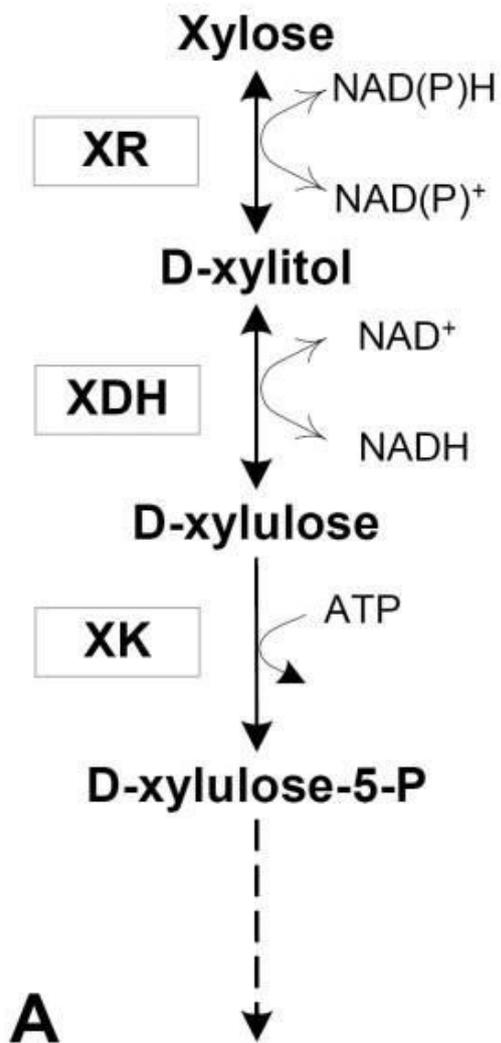


Figure 33. La voie métabolique oxydo-reductrice (Karhumaa et al., 2007)

Dans de bonnes conditions, ces souches de levures recombinantes ont démontré de bonnes performances. Karhumaa et al., 2007 ont ainsi obtenu un rendement éthanol aux alentours de 0,33 gETOH/g-xylose et une concentration finale à 13g/L lors de fermentation anaérobique de xylose pur (50g/l).

Lors de fermentation Fed batch SSF de canne de maïs prétraitée à la vapeur Öhgren et al., 2006 ont obtenu des concentrations en éthanol de l'ordre de 40g/L avec un rendement éthanol d'environ 0,39 (g ETOH/g sucres consommés)

2.8.1.3.7. Voie métabolique cofacteur indépendante (XI)

La voie métabolique du champignon *Piromyces sp* présent dans l'appareil digestif des ruminants, a été introduite chez *S. cerevisiae*.

Celle-ci consiste en l'expression d'une seule enzyme qui permet la transformation du xylose en D-xylulose en une seule étape.

Cette stratégie est intéressante car elle permet de se départir du cycle de renouvellement du pool de NADPH/NAD nécessaire à la voie XR/XDH.

De plus l'absence de molécule intermédiaire permet en théorie d'atteindre un meilleur rendement de conversion du xylose en éthanol.

Malgré ces atouts, l'introduction de la Xylose isomérase seule n'est pas suffisante pour atteindre une production d'éthanol élevée.

Plusieurs études ont démontré l'importance d'augmenter l'expression de plusieurs gènes de la voie des pentoses phosphates (Kuyper et al., 2005).

L'utilisation de la voie XI d'autres microorganismes a aussi donné de très bons résultats au cours des dernières années, notamment l'expression de la XI provenant de *Clostridium phytofermentans* (Brat et al., 2009)

D'autres stratégies, comme l'expression simultanée des deux voies (XR/XDH et XI) ont permis une amélioration des rendements (Cunha et al., 2019). Enfin des expériences de mutagenèse et sélection après expression de la XI ont aussi montré des résultats très encourageants. (Lee et al., 2012)(Seike et al., 2019)

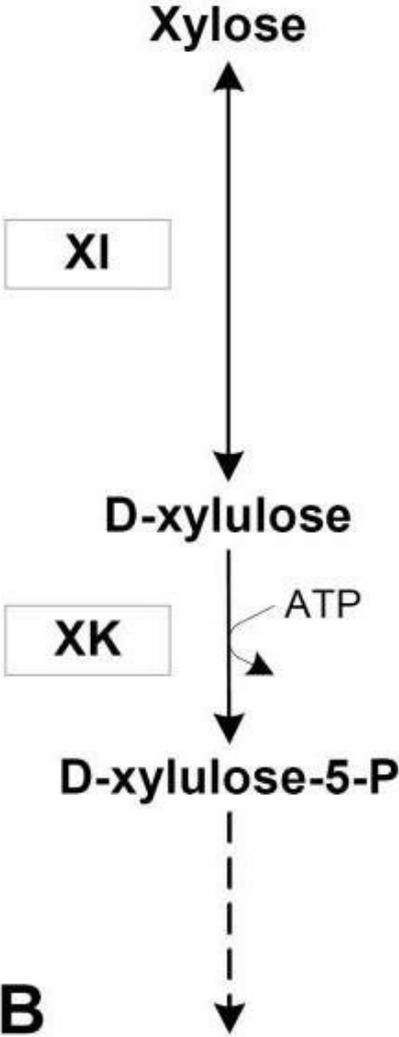


Figure 34. La voie métabolique Xylose Isomérase (XI) (Karhumaa et al., 2007)

3.MATERIELS ET METHODES

3.1. Matériel

3.1.1. Coproduit de maïs doux/ Sweet corn cob (SCC)

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

Toutes les biomasses lignocellulosiques ont été traitées dans un extrudeur bi-vis par les équipes du LCA dans leurs locaux de l'INP Toulouse.

3.1.2. Extrudeur bi-vis

Pour les étapes d'extrusion effectuées dans le cadre du projet, deux extrudeurs ont été utilisés.

Un petit extrudeur Clextral EV25 localisé dans les locaux du LCA à l'INP Toulouse a permis de prétraiter la très grande majorité de la biomasse utilisée dans ce projet. Ce même extrudeur couplé à un bioréacteur a été utilisé pour les expériences de couplage à l'échelle laboratoire.

Pour les manipulations à l'échelle pilote, nous avons eu accès à un Clextral EV53 localisé dans les locaux AGROMAT du LCA, sur le campus de l'ENIT de Tarbes. Cet extrudeur a aussi été couplé à un bioréacteur de 300L pour les expériences de couplages à l'échelle pilote.

L'extrudeur EV53 est composé de bi-vis de 1,90m de long dont le diamètre est de 53mm. Elles sont composées de 9 modules réglables en température. Une zone de filtration est aussi présente. L'alimentation en biomasse est assurée par un doseur SWB-300-N (K Tron) pouvant amener jusqu'à 200Kg/h.

Ce feeder est connecté à un densifieur 100KSW (Kreyenbourg) équipé d'une vis sans fin qui va forcer la pénétration de la biomasse dans le premier module de l'extrudeur.

Trois pompes à piston sont utilisées pour introduire les liquides, KOH dilué pour la partie alcaline, H₂SO₄ dilué pour la partie acide et finalement la solution de cocktail enzymatique. Les différents paramètres de l'extrudeur sont monitorés et régulés à partir d'un panneau de contrôle tactile.

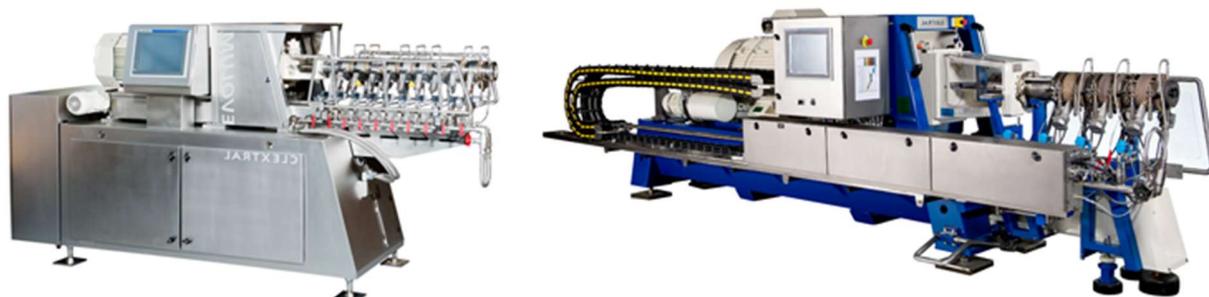


Figure 35. Extruder Ev25 et Ev53

Tableau 3. Caractéristiques principales des extrudeurs CLEXTRAL employés dans cette thèse

Extrudeur	CLEXTRAL	EV 25	EV 53
EVOLUM			
Débits d'entrée solide	<i>kg/h</i>	1-10	20-200
Alimentation		Doseur volumétrique à vis Ktron KCL-KT20 (Coperion, GmbH, Germany).	Doseur pondéral à bande SWB-300-N (K Tron)
Type d'introduction		Gravitaire	Densifieur 100KSW (Kreyenbourg)
Nombre de modules		7	9
Longueur utile de fourreau	<i>mm</i>	1000	1908
Diamètre externe de la vis	<i>mm</i>	25	53
Puissance moteur	<i>KW</i>	27	152
Vitesse maximum de vis	<i>tr/min</i>	1200	800
Pompes pour l'introduction des liquides			
Soude		Pompes à piston DKM SUPER JPP6.35 (CLEXTRAL, France)	Pompes à piston DKM KLCAMP112/12 (CLEXTRAL, France)
Acide		Pompes à piston DKM SUPER K 9916 (CLEXTRAL, France).	Pompes à piston DKM SUPER MD PP63 (CLEXTRAL, France)

Enzyme et solution tampon		Pompes à piston Clextral DKM SUPER J PP 3.175 ou Milroyal PMRD13493 SM 70	Pompes à piston Clextral SUPER KL CAMP150/32
Grille de Filtration		Filtre en demi-coquille, perforation 1mm	Filtre en demi-coquille, perforation 1mm

Les fourreaux de ces extrudeurs bi-vis sont constitués de 7 à 9 modules interchangeables en acier inoxydable. Les modules sont thermorégulés grâce à des colliers chauffants et un système de refroidissement assuré par une circulation d'eau piloté par des électrovannes. Ces modules peuvent être fermés ou ouverts pour l'introduction de matières solides, perfusés par des entrées de liquide ou encore équipés de grilles de filtration.

Les vis, co-rotatives et co-pénétrantes dont le profil est entièrement modulable, sont entraînées par un moteur à vitesse variable réglable par l'intermédiaire d'un boîtier de régulation ou d'un automate de contrôle. Le moteur est alimenté par un courant continu dont l'intensité est mesurée en permanence. Les paramètres de fonctionnement des extrudeurs bi-vis (vitesses de rotation des vis), les températures des différents modules du fourreau, et le contrôle des introductions de matières solides et de liquides sont contrôlés indépendamment.

L'élaboration de la configuration du fourreau des extrudeurs, ainsi que les profils de vis utilisées ont fait l'objet de travaux de thèse menés au LCA par M. Monica FONG (Fong, 2019)

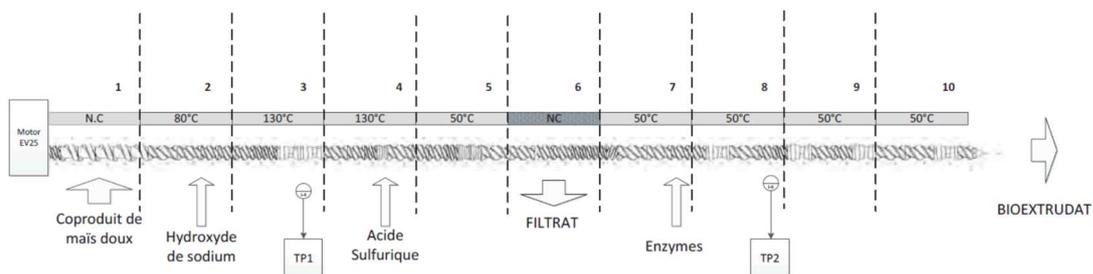


Figure 36. Exemple de configuration et profil de vis utilisé pour le pré-traitement de coproduit de maïs doux sur l'EVOLUM 25 (TP : Sondes de température)

3.1.3. Cocktails enzymatiques

Les cocktails enzymatiques utilisés dans cette étude ont été fournis par Novozymes (Franklinton, USA).

Le cocktail Cellic Ctec2 a été le plus utilisé pour son action cellulolytique et aussi hemicellulolytique.

Des tests ont été effectués avec le cocktail NS22002 qui développe une activité uniquement hemicellulolytique.

Les caractéristiques de ces deux produits sont détaillées dans le tableau suivant.

Tableau 4. Caractéristiques des cocktails enzymatiques utilisés dans cette étude. Données LCA

Référence Novozyme		Cellic® Ctec2	NS22002
Donnés 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 β-xylosidase	UI/mL	21,9	3,3
Activité α-arabinofuranosidase	UI/mL	1,9	0,74
Activité féruloyl esterase	UI/mL	0,22	9,2
Activité acétyle esterase	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 (2) Dosage réalisé par URCA (3) Dosage par Kit Lowry

3.1.4. Souches et milieux de fermentation

3.1.4.1. Souches utilisées

Pour ces travaux, nous avons utilisé une souche industrielle diploïde de *Saccharomyces cerevisiae* : la souche CelluX 4, fournie par la société Lesaffre. Cette

souche a été sélectionnée pour sa tolérance à des concentrations élevées d'éthanol et d'inhibiteurs.

Basée sur la souche Butalco IP (expression de XI provenant de *Clostridium phytofermentans*) elle a été modifiée pour sur-exprimer la XDH et être utilisée directement sous forme déshydratée.

Dans la plupart de nos expériences, nous avons utilisé notre stock de souches stockées à -80°C dans un milieu contenant 70% (v/v) de YEPD et 30% (v/v) de glycérol pur.

3.1.4.2. Compositions des milieux

Les souches congelées sont repiquées sur boîte de pétri contenant un milieu YEPD solide (15g/L d'agar-agar). Les boîtes sont conservées au maximum 2 mois à 4°C.

3.1.4.2.1. Milieux de remises en cultures

Plusieurs colonies sont suspendues dans un milieu riche YEPX (Yeast Extract Peptone Xylose) dont le pH est ajusté à 5 avec de l'acide ortho-phosphorique et qui a été préalablement stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C.

Tableau 5. Composition du milieu YEPX

Milieu YEPX 1 Litre	Gramme
Extrait de levure	10
Bactopeptone	20
Xylose	20
Eau demineralisée	qsp 1L

3.1.4.2.2. Milieu Minimum

Le milieu minimum est composé de sels essentiels à la viabilité et la bonne croissance des levures. En complément du glutamate de sodium permet

d'apporter une source azotée. Le pH est ajusté à 5 avec de l'acide ortho-phosphorique et le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 121°C.

Tableau 6. Composition du milieu minimum

Milieu minimum Xylose 1 Litre	Gramme
KH ₂ PO ₄	3,00
N ₂ H ₈ SO ₄	3,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,50
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	3,00
Sodium L-Glutamate 1-hydrate	1,10
D-Xylose	20,00
Eau MiliQ	Qsp 1L

Solutions d'oligo-éléments

Les oligoéléments sont préparés sous forme de solutions concentrées 1000 fois, stérilisées soit par autoclavage à 121°C soit par filtration sur membrane Minisart 0,2 µm (Sartorius). Ces solutions sont stockées 6 mois à 4°C.

Il est ajouté 1ml de ces solutions dans chaque litre de milieu minimum.

Tableau 7. Solution d'oligoéléments

Oligo Elements	g dans solutions concentrées	µg/Litre de Milieu Salin
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4,00	40,00
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,90	9,00
MnSO ₄ , H ₂ O	0,38	3,80
H ₃ BO ₃	0,30	3,00
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,50	5,00
Na ₂ MoSO ₄ , 2H ₂ O	0,60	6,00
CaCl ₂ , 2H ₂ O	2,30	23,00
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₆ , 6H ₂ O	2,30	23,00

Solutions de vitamines

Les vitamines sont préparées sous forme de solutions concentrées 1000 fois, stérilisées soit par autoclavage à 121°C soit par filtration sur membrane Minisart 0,2 µm (Sartorius). Ces solutions sont stockées 6 mois à 4°C.

Il est ajouté 1ml de ces solutions dans chaque litre de milieu minimum.

Tableau 8. Solution de vitamines

Vitamines	g dans solutions concentrées	µg/Litre de Milieu Salin
myo-Inositol	5,000	50,00
D-Pantothenic acid hemicalcium	0,240	2,40
Thiamine hydrochloride	0,200	2,00
Nicotinic acid	0,200	2,00
Pyridoxine hydrochloride	0,200	2,00
4-Aminobenzoic acid	0,040	0,40
Biotine	0,012	0,12

3.1.4.3. Préparation de l'inoculum

Plusieurs colonies sont récupérées sur boîte de pétri et suspendues de manière stérile dans 30ml de milieu YEPX dans des Erlenmeyer bafflés de 150ml. Ceux-ci sont placés en incubation à 30°C, sous agitation (120RPM) pendant 24h.

Ces cultures sont ensuiteensemencées dans 270ml de milieu minimum xylose 20g/L, à 30°C et sous agitation (120RPM) pendant 12h.

Les bio réacteurs peuvent ensuite êtreensemencés avec ce levain avec un taux d'ensemencement de 10% (V/V). L'absorbance initiale du levain est mesurée et une analyse microscopique est effectuée pour s'assurer de la viabilité et de la non-contamination de ces précultures. De l'extrait de levure à hauteur de 2g/Kg est ajouté au moût pour permettre un bon démarrage de la fermentation.

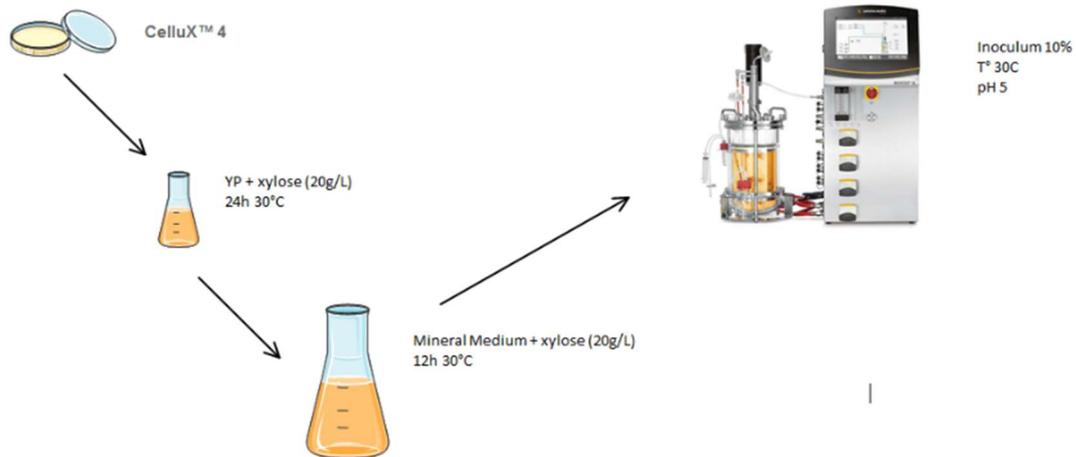


Figure 37. Chaîne d'inoculation utilisée pour les manipulations en bioréacteur 5L

3.1.5. Bioréacteurs

Les expériences à l'échelle laboratoire ont été réalisées dans des fermenteurs Sartorius B-DCU de 5 Litres avec un volume de fermentation entre 2 et 3 litres, dirigés par le logiciel **BioPAT® MFCS**.

Ces bioréacteurs sont préalablement stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes, puis la matière prétraitée est ajoutée en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter une contamination.

Les fermenteurs sont régulés en température à 30°C par circulation d'eau dans la double enveloppe de la cuve et le pH est maintenu à pH5 par ajout d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 5 Molaire régulé par PID.

Les fermenteurs sont aussi équipés de condenseurs pour éviter une éventuelle évaporation des molécules volatiles.

L'agitation est obtenue grâce à l'utilisation de deux hélices marines permettant un bon mélange et facilitant ainsi les transferts de masse. Elle est maintenue aux alentours de 200-250RPM

Pour les expériences de Fedbatch, un fermenteur Fermentec de 15 Litre couplé à un petit extruder bi-vis ont été utilisés. Ils sont contrôlés par 2 automates Siemens. L'extrudeur, nourrit par une trémie, ne sert qu'à convoyer la matière (biomasse prétraitée) et à remplir le fermenteur à un rythme prédéterminé et mesurable. La température est régulée à 30°C et le pH est maintenu à pH5 par ajout automatique d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH).

Le fermenteur est préalablement stérilisé à la vapeur. Celui-ci est équipé d'un condenseur pour éviter une éventuelle évaporation.

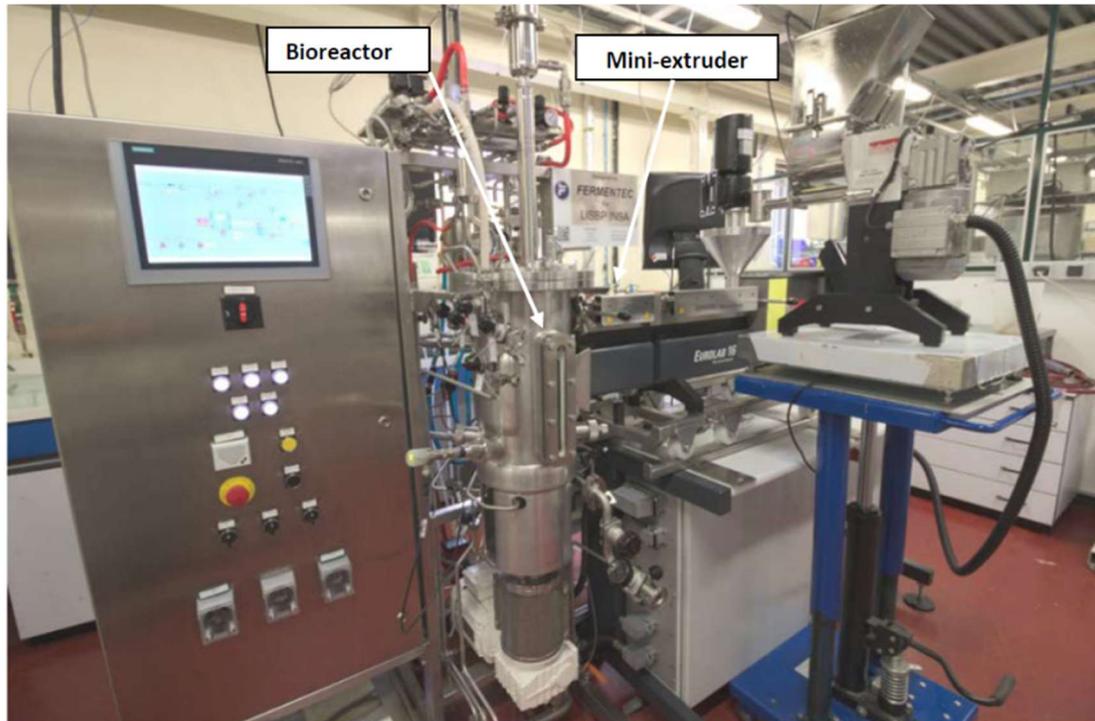


Figure 38. Photographie du matériel utilisé lors des expériences de Fedbatch

Pour les expériences de couplage au LCA (INP Toulouse), un bioréacteur Solaris de 22L est connecté directement à la sortie d'un extrudeur Clextral EV25. Le réacteur est régulé en température à 30°C, et est pourvu d'un condenseur pour éviter les évaporations. Le pH est régulé manuellement à pH5 par ajout d'une solution concentrée d'hydroxyde de potassium à 5Molar.

L'agitation est assurée par deux hélices marines et un racleur en fond de réacteur.



Figure 39. Bioréacteur couplé à l'extrudeur Clextral EV25

3.1.6. Pilote

Pour les expériences à l'échelle pilote, un extrudeur Clextral EV53 (présenté ultérieurement) est connecté à un convoyeur à vis sans fin qui permet de remplir un bioréacteur en acier inoxydable de 300 Litres. Le mélange se fait grâce à une lame hélicoïdale dont le sens de rotation peut s'inverser automatiquement toutes les minutes, permettant donc de déplacer le substrat de haut en bas de l'axe de rotation. Ce réacteur n'est pas hermétique et n'est pas équipé de condenseur, les

expériences ne se déroulent donc pas en environnement stérile, et on observe une perte significative d'éthanol par évaporation au cours du temps.



Figure 40. Vis sans fin de convoyage et bioréacteur de 300 litres pour les expériences à l'échelle pilote.



Figure 41. Couplage extruder bivis et bioréacteur à l'échelle pilote

3.2. Méthodes

3.2.1. 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. Environ 1g de matière est pesé dans un fritté puis il est ajouté 100ml de réactif Agent Detergent Fiber (ADF) ou Neutral Detergent Fiber (NDF). Le tout est porté à ébullition et maintenu à 100°C pendant 1h.

Ensuite le milieu est filtré à travers les frittés qui sont par la suite pesés, séchés, minéralisés puis pesés à nouveau (norme NF V 03-903).

Suite aux traitements ADF les frittés vont être mélangés à 25ml de solution Acid Detergent Lignin (ADL) pendant 1h30 à température ambiante la solution est de nouveau filtrée. Les frittés sont lavés avec une solution déminéralisante jusqu'à blanchissement puis lavés à l'éthanol 80% et finalement pesés, séchés, minéralisés et pesés à nouveau.

Tableau 9. Compositions de différentes solutions utilisées

Agent Detergent Fiber (ADF)

Cetyl trimethyl ammonium bromide	20g
H ₂ SO ₄	26,8 ml
Qsp 1L Eau distillée	

Neutral Detergent Fiber (NDF)

Sodium Lauryl Sulfate	30g
Sodium tetra acetate ethylene diamine	18,61g
Disodium Phosphate	4,56g
Sodium Borate 10H ₂ O	6,81g
Ethylene glycol monoethyl ether	10 ml
Qsp 1L Eau distillée	

Acid Detergent Lignin (ADL)

KMnO ₄	33,3g
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	2g
AgNO ₃	0,05g
acétate de potassium	3,33g
acide acétique	166,66 ml
ter-butanol	133,33ml
Qsp 1L Eau distillée	

Solution déminéralisante

acide oxalique déshydraté	50g
Ethanol 95%	700ml
HCL (35%)	50ml
Qsp 1L Eau distillée	

Le taux de cellulose est calculé selon la formule suivante :

$$T_c = \frac{m_{ADL1} - m_{ADL2}}{m_{ADL0}}$$

m_{ADL0} = masse avant traitement ADL

m_{ADL1} = masse après traitement ADL

m_{ADL2} = masse minérale après traitement ADL

Le taux d'hémicelluloses est calculé selon la formule suivante :

$$T_{hc} = \frac{m_{ADF1} - m_{ADF2}}{m_{ADF0}} - \frac{m_{NDF1} - m_{NDF2}}{m_{NDF0}}$$

m_{ADF0} = masse avant traitement ADF

m_{ADF1} = masse après traitement ADF

m_{ADF2} = masse minérale après traitement ADF

mNDF0 = masse avant traitement NDF

mNDF1 = masse après traitement NDF

mNDF2 = masse minérale après traitement NDF

Le taux de lignine est calculé selon la formule suivante :

$$Tl = tc - \frac{mADF1 - ADF2}{mADF0}$$

3.2.2. Hydrolyses enzymatiques

Les cocktails enzymatiques Cellic Ctec 2 et NS22002 ont été utilisés à des températures optimales de 50°C ou de 30°C pour refléter les paramètres de la SSCF.

La charge enzymatique de CellicCtec2 a été fixée à 15FPU/g d'extrudât complétement ou non avec 10% de NS22002.

Les tests d'hydrolyses enzymatiques ont été menés sous divers dispositifs.

A l'INSA nous avons mené ces tests soit en bioréacteurs de 5 L soit en Erlenmeyer. Au LCA, ces analyses ont été effectuées dans un dispositif spécial Tornado™. Les échantillons ont été mis dans des ballons agités de 100mL à 30RPM.

Les bioextrudats/extrudats ont été dilués dans du tampon citrate-phosphate pH5 pour atteindre le taux de matières sèches désiré.

Un ajout d'azide de sodium a été fait pour limiter les risques de contamination de l'hydrolysate. Des échantillons ont été prélevés, centrifugés, puis analysés par HPLC pour déterminer la concentration des sucres et de l'éthanol.

Pour les calculs des rendements d'hydrolyse, nous avons utilisé les équations suivantes :

$$CG = \frac{m \text{ glucose libéré}}{m \text{ cellulose} \times 1.11 \pm m \text{ glucose enzyme}} \times 100$$

$$CX = \frac{m \text{ xylose libéré}}{m \text{ hémicelluloses} \times 1.11 \pm m \text{ xylose enzymes}} \times 100$$

CG et CX correspondent aux rendements de conversion de glucose et de xylose respectivement. *m* glucose et *m* xylose correspondent à la masse des sucres produits, *m* cellulose et *m* hémicellulose à la masse de cellulose et hémicellulose contenue dans l'extrudat et déterminée par hydrolyse acide (ADF-NDF). *m* glucose enzyme, *m* xylose enzyme correspondent à la masse de sucres rajoutés par le cocktail enzymatique.

3.2.3. SSCF en bioréacteurs 5L Sartorius

Des prélèvements de 3ml sont effectués dans des tubes de 5ml. Ceux-ci sont centrifugés 7 min à 5000g puis le surnageant est filtré sur membrane Sartorius 0,45um avant d'être analysé par HPLC.

3.2.4. SSCF réalisée dans le réacteur de 22L Solaris

Des prélèvements de 10ml à 25ml sont réalisés dans des tubes de 25ml ou 50ml. Ceux-ci sont centrifugés 7 min à 5000g puis le surnageant est filtré sur membrane sartorius 0,45um avant d'être analysé par HPLC.

3.2.5. SSCF à l'échelle pilote

Des échantillons de 20-25ml sont réalisés dans des tubes de 50ml. Ceux-ci sont centrifugés 7 min à 5000g puis le surnageant est filtré sur membrane Sartorius 0,45um avant d'être analysé par HPLC.

3.2.6. Mesure de la concentration de la biomasse

La concentration en biomasse a été mesurée de deux façons distinctes :

- Mesure de la densité optique (DO) à 620nm

La densité cellulaire est mesurée par spectrophotométrie à 620nm dans une cuve en verre permettant un trajet optique de 2mm. En vue de rester dans la gamme de mesure de l'appareil, les échantillons sont dilués avec de l'eau milliQ pour obtenir une DO comprise entre 0,1 et 0,5.

- Mesure de la masse sèche par filtration, séchage et pesée

La biomasse est estimée par une méthode gravimétrique, un volume de prélèvement déterminé est filtré par une membrane SARTORIUS® polyamide 0,45 µm grâce à une pompe à vide. Les membranes sont ensuite séchées dans une étuve sous vide (60°C, 200mm Hg) pendant 48h puis pesées. La masse sèche est déterminée en soustrayant la masse avant filtration à la masse obtenue après filtration.

3.2.7. Analyse chromatographique

Le glucose, le glycérol, l'éthanol et les acides organiques (citrate, lactate, acétate, succinate...) sont mesurés au cours de chaque fermentation par chromatographie en phase liquide à haute performance.

Un système ThermoFisher Scientific Dionex Ultimate 3000 est utilisé pour séparer les molécules à l'aide d'une colonne Aminex HPX 87 H, 300 mm x 7,8 mm (50°C) munie d'une pré-colonne à un débit de 0,5ml/min. La quantification des composés est obtenue grâce à un détecteur UV (210 nm) ainsi qu'un réfractomètre. La phase mobile utilisée est une solution d'acide sulfurique 5mM. Un étalonnage a été préalablement effectué à partir de solutions standard comprenant différentes concentrations des composés d'intérêts.

3.2.8. Analyse statistique

La grande majorité de nos expériences ont été effectuées une seule fois, dans la foulée du prétraitement. En effet, la conservation du bioextrudat étant délicate, il nous a fallu planifier nos fermentations en fonction des expériences de nos partenaires.

La faible disponibilité de nos substrats prétraités, en temps mais aussi en quantité, explique donc que la plupart du temps, nos expériences ont dû être effectuées en une seule fois. Pour les expériences que nous avons réitérées, la variabilité inhérente à la matière première ainsi qu'aux paramètres de prétraitement entraîne

des différences notables dans les résultats. Pour se départir de cela, nos résultats présentent le plus souvent des comparatifs effectués avec les mêmes matières prétraités.

Cela explique donc l'absence de barre d'erreurs et d'analyse statistiques dans la plupart de nos tableaux de résultats, ainsi que les variabilités de performances observées entre les différents benchmarking.

4. PROCEDE BABET REAL

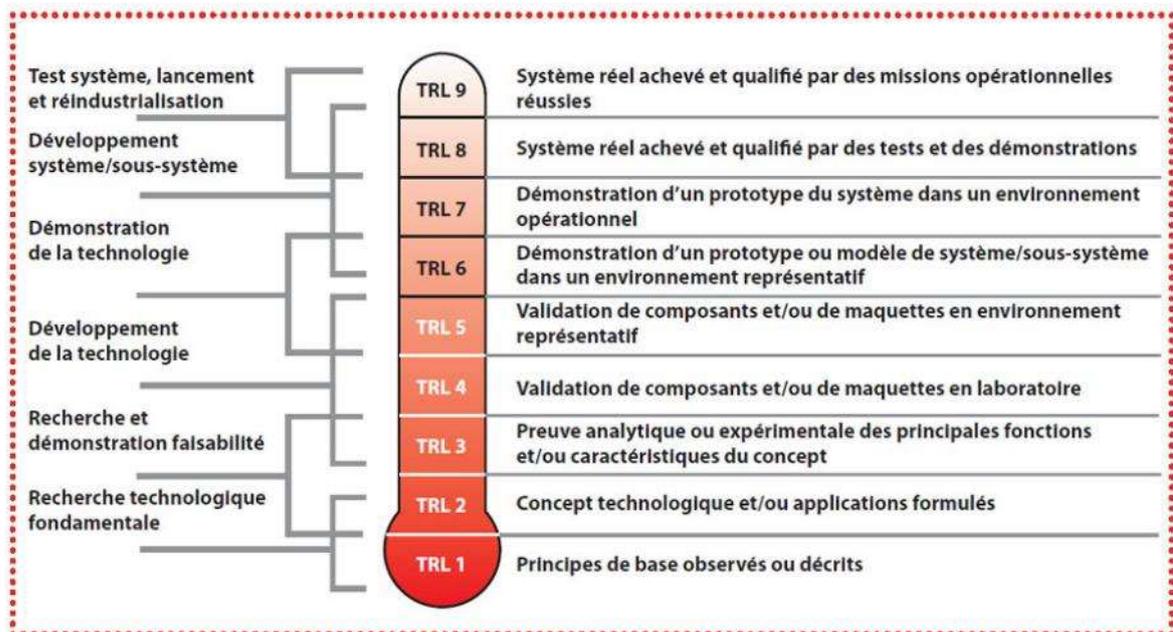
Le but du projet BABET REAL-5 est de développer une solution alternative pour la production de bioéthanol de seconde génération. L'idée du projet est de favoriser une approche locale et une industrie de petite taille, applicable à de nombreuses biomasses lignocellulosiques dans des environnements ruraux.

C'est un projet sur 4 ans avec trois objectifs principaux :

- Atteindre des performances techniques, économiques et environnementales facilement transposables à l'échelle de petites usines industrielles (30 000 tonnes par an).
- Identifier des stocks de biomasse lignocellulosique dont la chaîne d'approvisionnement soit sûre et durable en vue de permettre l'évaluation et la sélection de cas potentiel pour l'Europe et l'Amérique latine.
- Apporter toutes les données nécessaires à l'évaluation et à la l'augmentation d'échelle pour un passage en phase TRL6-7.

La base du projet est un nouveau concept de prétraitement de biomasse lignocellulosique développé et breveté (FR2991691/WO2013182827) par l'INP Toulouse (France), l'UNAM (Mexico) et le CIEMAT (Spain), pendant le projet BABETHANOL (2009-2013).

Ce nouveau concept de prétraitement permet la déstructuration de la matrice lignocellulosique et l'initiation de l'hydrolyse enzymatique, à haut débit, tout en permettant le convoyage de cette matière prétraitée directement dans un bioréacteur dans lequel se dérouleront les étapes suivantes, à savoir la saccharification et la fermentation. Cela permet d'effectuer toutes les étapes de prétraitement, de saccharification et de fermentation de manière compacte dans un seul réceptacle (bioréacteur). Ce procédé a atteint un niveau TRL4 pendant BABETHANOL et le but de BABETREAL5 est de dépasser le niveau TRL5 dans des environnements pertinents.



Source : « Quelques explications sur l'échelle des TRL d'après le plan stratégique de recherche & technologie de défense et de sécurité - dga 2009 »

Figure 42. Echelle TRL permettant d'évaluer le niveau de maturité d'une technologie.

Les performances au stade BABETHANOL étaient les suivantes :

- Une production d'éthanol autour de 150 litres d'éthanol produit par tonne de biomasse en ne fermentant que les hexoses (glucose)
- Une efficacité énergétique de 0,5MJ consommé par MJ produit (gate to gate) et une production de gaz à effet de serre d'environ 30-60 équivalent CO₂/MJ produit.

L'objectif du projet est d'améliorer toutes ces valeurs et d'assurer une viabilité économique en visant des petites usines pouvant traiter 30 000 tonnes de biomasse (masses sèches) par an.

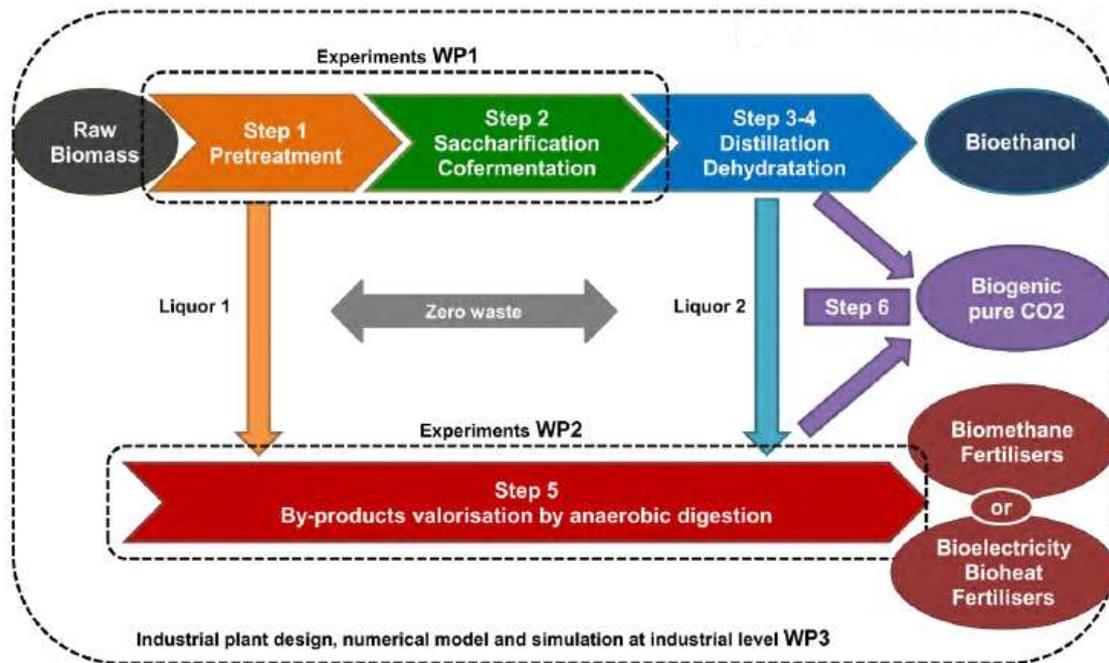


Figure 43. Schéma récapitulatif du procédé développé par BABETREAL5

4.1. Biomasses

Durant ce projet, nous avons testé les performances de 7 biomasses lignocellulosiques différentes :

- Paille d'orge (BS) (Allemagne)
- Rafle et résidu de maïs doux (SCC) (France)
- Bagasse d'agave bleu (BAB) (Mexique)
- Paille de blé (WS) (France/Allemagne)
- Résidu de canne à sucre (SCR) (Argentine)
- Résidu forestier d'eucalyptus (EFR)(Uruguay)
- Paille de maïs (CR) (France, Allemagne)

Toutes ces biomasses ont des morphologies et des compositions en cellulose, hémicellulose et lignine différentes. La figure 34 présente brièvement leurs caractéristiques.

Tableau 10. Caractéristiques des différentes biomasses lignocellulosique utilisées

						
Barley Straw	Blue Agave Bagasse	Sweet Corn Cob	Wheat Straw	Corn stover	Sugarcane Crop residue	Eucalyptus Forest residue
Cel 32,9% Hem 29% Lig 18,77% Oth 19,3%	38,9% 16,9% 18,4% 25,8%	34,4% 35,7% 7,5% 22,4%	33,7% 25,5% 16,3% 24,5%	48,2% 35,5% 6,9% 9,4%	29,2% 23,9% 18,1% 28,8%	46,9% 12,8% 31,1% 9,2%

Chaque biomasse a été sélectionnée après une étude approfondie de sa disponibilité, de son coût d'achat et du coût environnemental de son prélèvement, et ce dans chaque région spécifique.

Pour chaque biomasse, il a fallu adapter le prétraitement selon les caractéristiques physicochimiques de chacune, en vue d'obtenir des résultats à la hauteur de nos attentes.

Tableau 11. Résultats obtenus avec les différentes biomasses testées.

	Barley Straw (BS)	Blue Agave Bagass (BAB)	Sweet Corn Cob (SCC)	Wheat Straw (WS)	Corn Stover (CS)	Sugarcane Residue (SCR)	Eucalyptus Forest Residue (EFR)
Solid loading %	25	20	19	21	19	21	20
Hydrolysis yield %	80	79	85	64	50	53	53
Fermentation efficiency %	75	85	87	82	94	95	85
EtOH concentration g/l	55	54	52	47	32	36	24

Pour la région du Sud de la France, « la rafle et résidu de maïs doux » (Sweet Corn Cob) a été la biomasse sélectionnée. Le maïs doux est une variété caractérisée par une forte teneur en sucres solubles (>25%). Celui-ci est récolté une fois par an entre juillet et octobre pour être consommé frais et non comme un légume sec.

Cette biomasse nous a été fournie par la conserverie SARL Soupro+ (Castelmoron sur Lot, Nouvelle Aquitaine, France) après traitement des grains. Les épis récoltés sont effeuillés et les grains sont coupés de la rafle pour être mis en conserve. La biomasse récupérée est donc composée essentiellement de cette rafle broyée ainsi que des spathes (feuilles qui enveloppent l'épi).

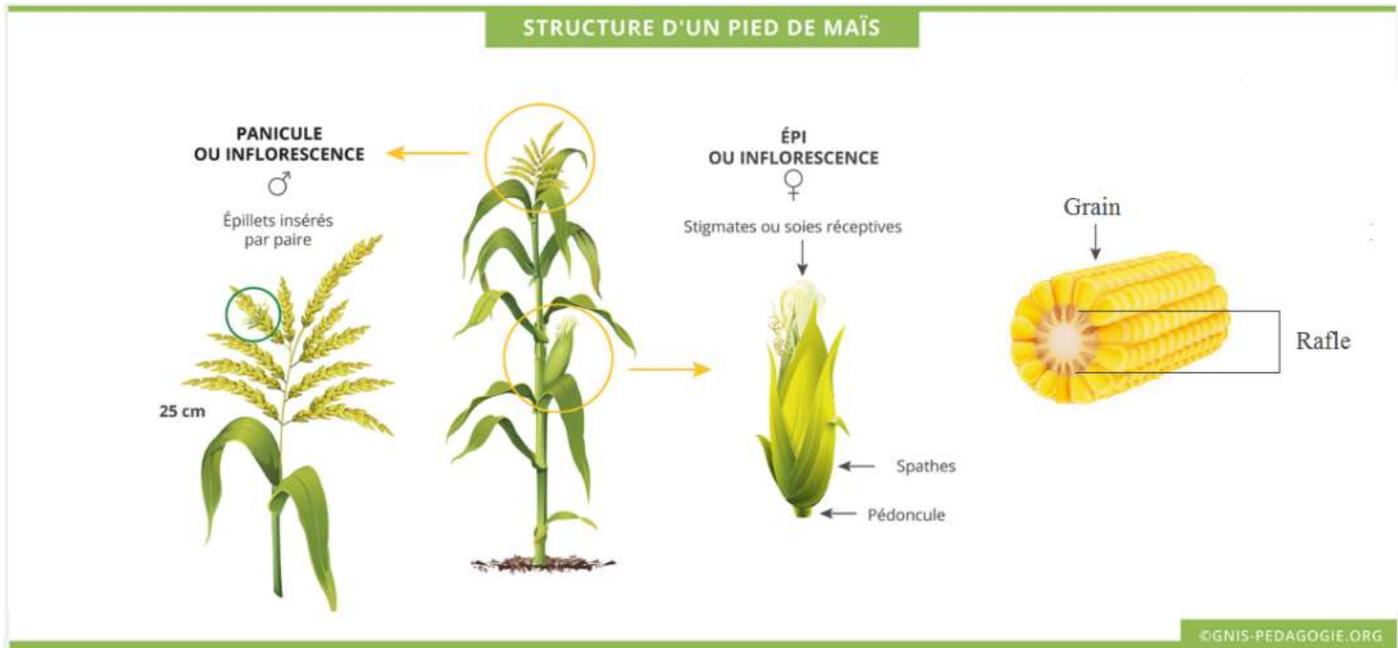


Figure 44. Structure d'un plant de maïs

Plusieurs lots de maïs ont été récupérés au cours du projet, chaque lot ayant subi des séchages et broyages dans des conditions différentes (plein, champs, mécanisés...).

Cela explique les différences de résultats obtenus entre les expériences n'ayant pas utilisé le même lot.

4.2. Prétraitement

La biomasse séchée, et préalablement broyée, entre dans l'extrudeur où elle va subir un prétraitement mécanique, thermique, chimique et enzymatique. Après un temps de séjour court (quelques minutes) cette biomasse ressort de l'extrudeur sous forme de bioextrudat, prêt à être sujet à l'hydrolyse enzymatique et à la fermentation des sucres.

Plusieurs actions se combinent dans l'extrudeur pour permettre une déstructuration optimale de la matrice lignocellulosique :

- 1) Un traitement thermo mécanique entraînant une déstructuration de la biomasse. Les températures et le profil de la vis sont personnalisables permettant une grande variation de l'action mécanique (cisailage, compression, expansion, convoyage) et thermique selon la biomasse.
- 2) Une déstructuration chimique grâce à l'injection d'une solution alcaline (NaOH)
- 3) Une neutralisation à un pH de 5, optimal pour l'hydrolyse enzymatique et la fermentation, grâce à l'injection d'une solution d'acide (H₂SO₄)

- 4) Une filtration à l'aide d'un profil de vis spécifique (contre-filets) qui va permettre d'augmenter la masse sèche du bioextrudat ainsi que de récupérer une partie des composés solubles.
- 5) L'injection d'un cocktail enzymatique directement dans l'extrudeur ce qui va permettre un mélange optimal et une infusion de la biomasse par ce cocktail, entraînant de ce fait le démarrage immédiat de l'hydrolyse des polysaccharides.

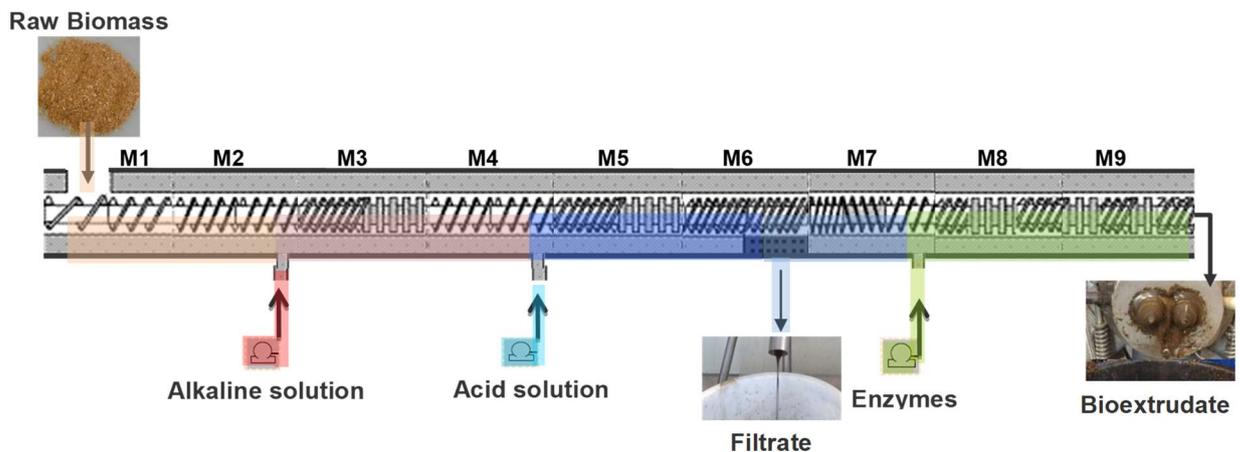


Figure 45. Schéma récapitulatif du prétraitement par extrusion bi-vis du projet BABETREAL-5

Les performances de ce prétraitement ont été directement corrélées avec les paramètres suivants :

- 1) La vitesse de rotation des bi-vis dans le fourreau de l'extrudeur
- 2) Le profil des vis en vue d'obtenir des forces mécaniques adéquates (cisailage, compression et expansion)
- 3) La concentration des solutions alcalines et acides utilisées
- 4) La température appliquée dans la zone de déstructuration (M3 et M4)
- 5) La dose de cocktail enzymatique injectée (FPU par gramme de biomasse sèche)

Chaque paramètre joue un rôle sur l'efficacité du prétraitement mais aussi sur son coût économique et environnemental. Il a donc fallu, pendant la première partie du projet, trouver la juste balance entre tous ces paramètres en vue de limiter les coûts, l'énergie consommée et l'impact environnemental tout en conservant de bonnes performances de prétraitement.

Le choix s'est porté sur l'utilisation de NaOH comme traitement alcalin au vu de ses performances significativement supérieures aux autres solutions ainsi qu'à son coût d'achat et son empreinte carbone réduite (-40% comparée au KOH).

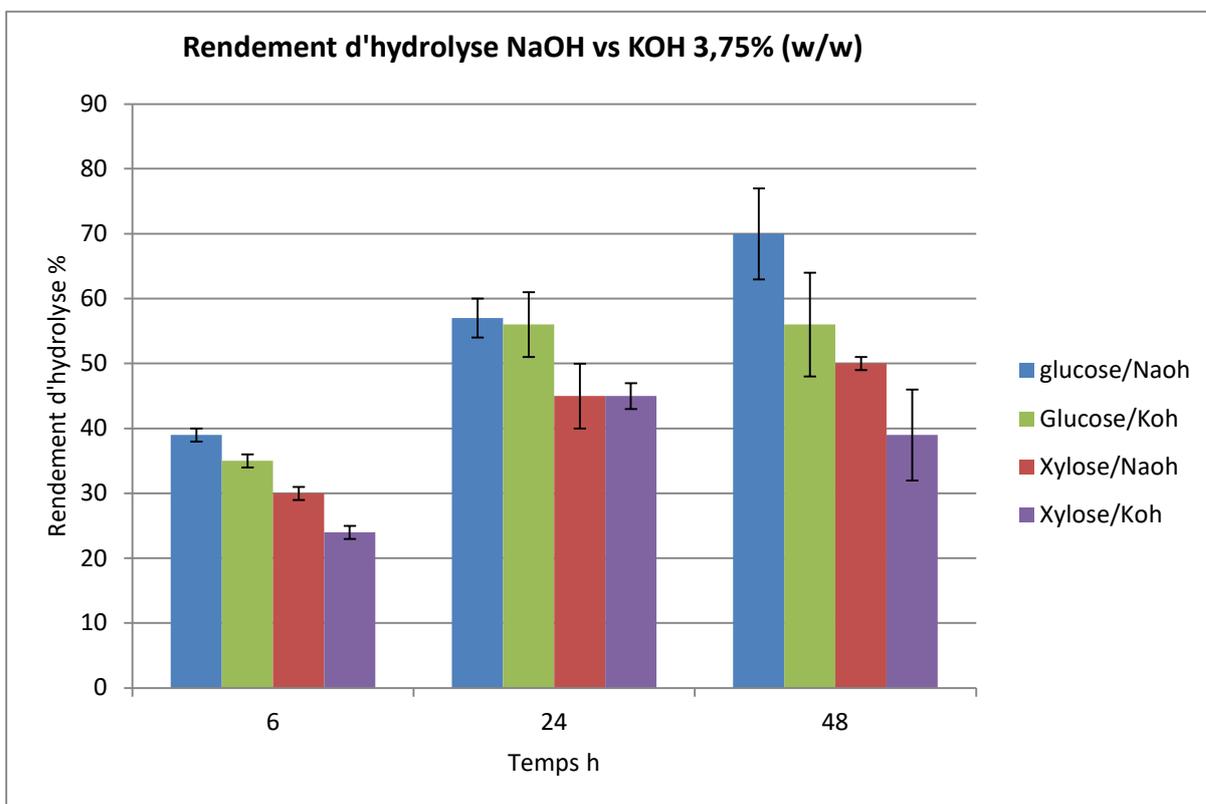


Figure 46. Performances du NaOH comparé au KOH sur le rendement d'hydrolyses du glucose et du xylose. Pré-traitement à 150°C, solution alcaline à 3.75% (w/w). Données produite par INPT et UNAM

Une phase d'optimisation a ensuite permis de réduire au maximum les quantités de NaOH utilisées.

Les paramètres suivants ont été sélectionnés :

- Pour SCC, une concentration de NaOH de 6% et une température, dans les modules chauffés, de 120°C
- Pour BAB : une concentration de NaOH de 3,8% et une température, dans les modules chauffés, de 120°C
- Pour BS : une concentration de NaOH de 4,5% et une température, dans les modules chauffés, de 100°C

Pour ce qui est du tamponnage acide, le H₂SO₄ a été sélectionné pour son impact environnemental faible et son coût d'achat.

4.3. Hydrolyse enzymatique

Pour la partie hydrolyse enzymatique du projet, il a été décidé d'utiliser le cocktail enzymatique Cellic Ctec2 produit et fourni par Novozymes. Il a été décidé de compléter ce cocktail enzymatique avec 10% (v/v) de NS20020 de Novozymes (xylanase), qui est un cocktail enzymatique spécialisé dans le clivage des hémicelluloses.

L'empreinte carbone de ces cocktails enzymatiques étant très élevée, leurs coûts également, de nombreux tests ont été effectués pour arriver à déterminer la concentration optimale du cocktail enzymatique Cellic Ctec2 permettant une bonne hydrolyse et donc de bonnes performances du procédé sans en grever les bilans économique et environnemental.

Pour cela des expériences de SSCF ont été conduites à 21% de masse sèche à partir de bioextrudat prétraité par l'INPT avec les paramètres d'extrusion sélectionnés auparavant pour leur efficacité.

Plusieurs quantités de cocktail enzymatique Ctec2 ont été testées, 18,5 FPU/g biomasse sèche, 12,7FPU/g, 6,2FPU/g ou 3FPU/g.

Le bilan ci-dessous montre que les meilleurs résultats se situent entre 6,2 et 12,7 FPU/g

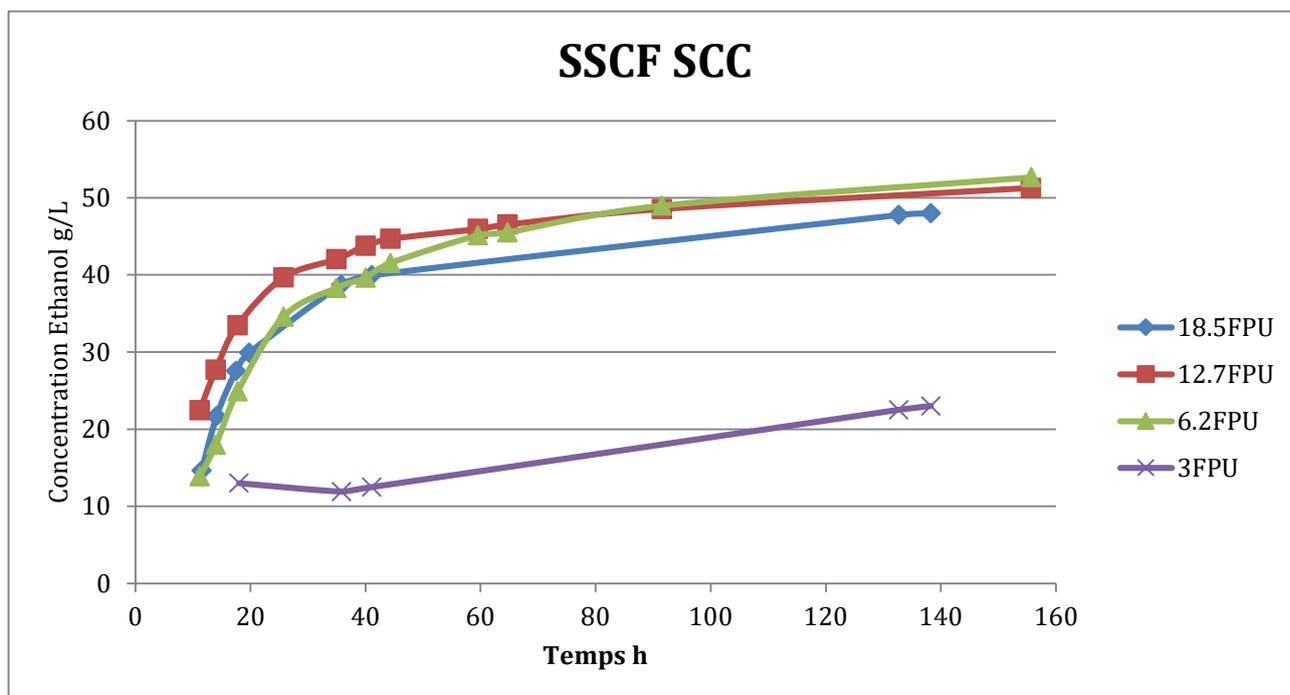


Figure 47. Graphique représentant la production d'éthanol en g/L au cours du temps en SSCF avec du SCC prétraité en utilisant différentes concentrations de cocktail enzymatique Cellic Ctec2

Tableau 12. Conditions et résultats des tests menés en SSCF avec du SCC prétraité en utilisant différentes concentrations de cocktail enzymatique Cellic Ctec2

Taux de matière sèche % m/m	Ctec2 FPU/g DM	NS20022 % de Ctec2 (ml)	Concentration finale EtOH g/L	Xylose résiduel g/L	Rendement éthanol (%rendement max) sucres consommés	Rendement éthanol (%rendement max)	Rendement en Tonne de biomasse	Litre/ de
21	18,5	10	48	1	80%	78%	233	
21	12,7	10	52	2	87%	86%	256	
21	6,2	10	53	0	82%	82%	255	
21	3	10	22	3	35%	35%	106	

Pour la suite du projet toutes les expériences ont été validées en utilisant 15FPU/g d'extrudat sec de Cellic Ctec2 en vue d'être sûr que l'hydrolyse enzymatique ne soit pas l'étape limitante.

Des tests sur l'ajout d'hémicellulases (NS20002) ont été effectués et n'ont pas démontré d'avantage apporté par ces hémicellulases. Il a donc été décidé de ne pas en rajouter et de continuer avec le cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 uniquement. Pour référence, l'équipe de Han et al., 2016 qui propose un système de prétraitement assez similaire au notre, utilise une concentration de Cellic Ctec2 de 30 FPU/g additionné de 15% de Cellic Htec2 pour des résultats assez similaires aux nôtres : concentration finale en éthanol de 59g/L, avec 23% de matières sèches de miscanthus prétraité par extrusion.

4.4. Fermentation

Pour le projet BABETREAL5 la souche de levure commerciale CelluX 4 de Lesaffre a été sélectionnée pour mener à bien les fermentations de la biomasse lignocellulosique prétraitée.

CelluX 4 est une souche de *S. cerevisiae* génétiquement modifiée spécialement développée pour l'industrie de l'éthanol cellulosique depuis 2012.

Elle possède une grande tolérance à l'éthanol et a été testée pour résister à de nombreux stress.

Basée sur la souche Butalco IP (expression de XI provenant de *Clostridium phytofermentans*) elle a été modifiée pour sur-exprimer la XDH et être utilisée directement sous forme déshydratée.

Cette souche a subi de nombreuses étapes de sélection en vue d'acquérir une résistance aux inhibiteurs optimale.

5.COMPREHENSION DES MECANISMES LIMITANT LES PERFORMANCES ET OPTIMISATION DU PROCEDE

Nous avons développé une stratégie sur 4 axes, qui représentent chacune des étapes du procédé, même si leurs actions se recoupent et dépendent les unes des autres.

En premier lieu, pour ce qui est du prétraitement, nous avons décidé d'implémenter une phase de filtration, ainsi que de mener des études d'hydrolyse et de fermentation avec de la biomasse traitée et lavée en vue d'éliminer les sels et inhibiteurs solubles.

Pour la partie microorganismes, nous nous sommes concentrés sur les effets potentiels des sels sur le métabolisme de la levure. Pour cela nous avons mené des études en réacteur continu sur milieu minium.

Pour la partie hydrolyse, nous avons voulu savoir quel pouvait être l'impact de la cinétique de libération des sucres en la modulant.

Pour cela des expériences de pré-hydrolyse ont été effectuées en vue de limiter les concentrations en glucose qui pourraient être délétères à la consommation du xylose.

Nous avons ensuite essayé d'effectuer une pré-hydrolyse sélective en vue de libérer tout le xylose avant la libération du glucose et ainsi potentiellement limiter l'impact de la répression catabolique du glucose sur le xylose.

Pour ce qui est de la conduite de procédé, nous avons essayé de contrebalancer un potentiel effet des haut taux de matières sèches, en effectuant des expériences en Fed batch, permettant d'apporter la matière première en continu dans un temps défini.

5.1. Effet du prétraitement

5.1.1. Ajout d'une phase de filtration

L'obtention de titres élevés en éthanol nécessite la mise en œuvre de culture à haute concentration en sucres fermentescibles et par conséquent la mise en œuvre de extrudat/bioextrudat à haute teneur en matières sèches.

Afin d'augmenter cette matière sèche, un module de filtration a donc été rajouté dans la filière d'extrusion. De par l'utilisation de contrefilets sur la bivis, il a été possible de créer un bouchon dynamique entraînant une forte compression de la matière et son essorage au travers du module de filtration.

Nous avons ainsi testé si l'ajout d'une phase de filtration au sein de l'extrudeur pouvait impacter les résultats de l'hydrolyse et de la fermentation.

Des mesures nous ont permis de démontrer une réduction d'environ 75% de la matière minérale avec du substrat soumis à l'étape de filtration.

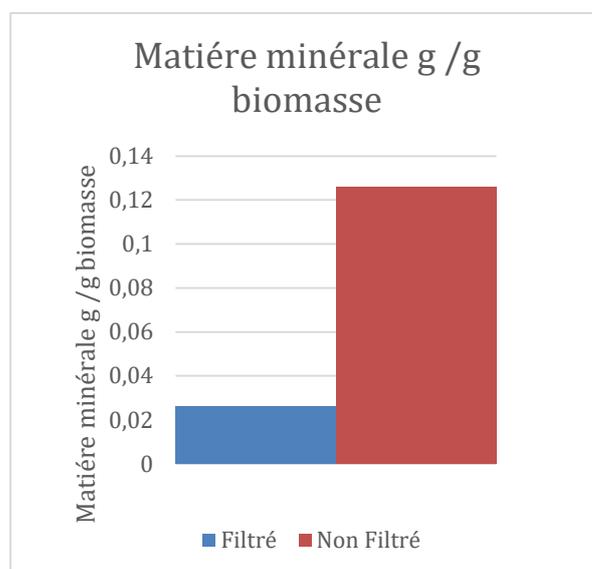


Figure 48. Diminution de la matière minérale en g/g biomasse après l'ajout d'une étape de filtration dans la filière d'extrusion

Parallèlement, des expériences de saccharification ont démontré une légère amélioration des rendements d'hydrolyse après filtration, et ce, principalement pour la production de glucose.

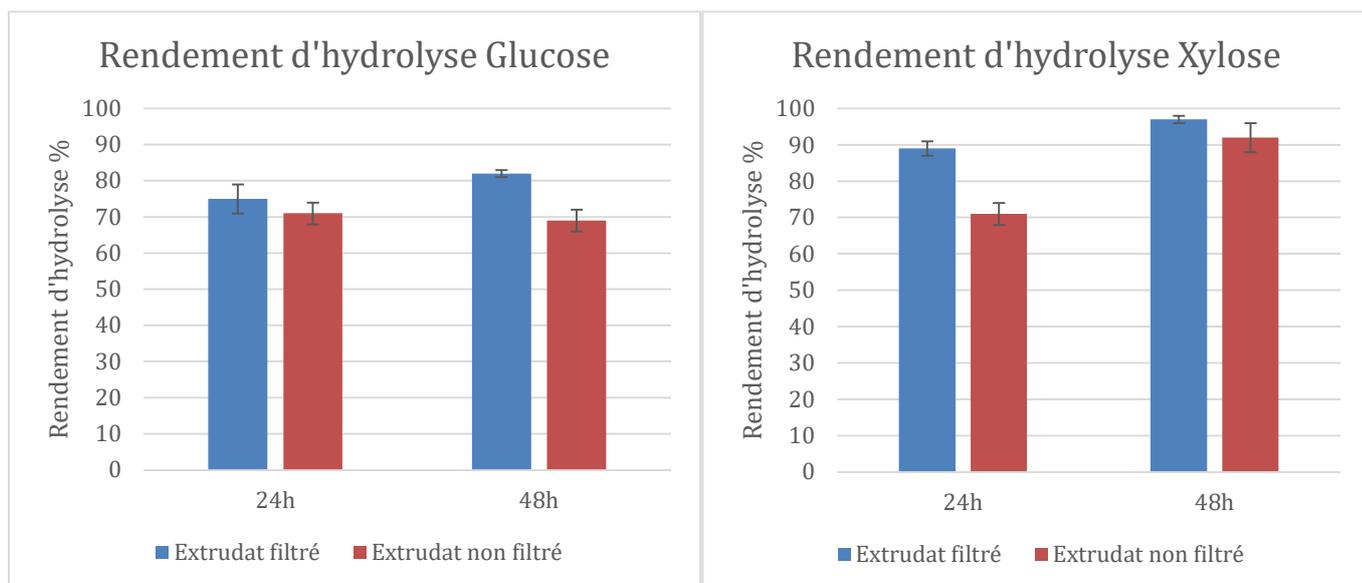


Figure 49. Résultats de l'hydrolyse enzymatique (INPT)

Nous avons ensuite effectué des essais comparatifs de fermentation de bioextrudat de SCC, avec ou sans filtration.

Nous avons observé une très forte amélioration des performances lors de fermentation en SSCF de bioextrudat prétraité avec une étape de filtration. Une concentration finale de 48g/L d'éthanol a été obtenue après filtration contre seulement 27g/L sans filtration (+70%).

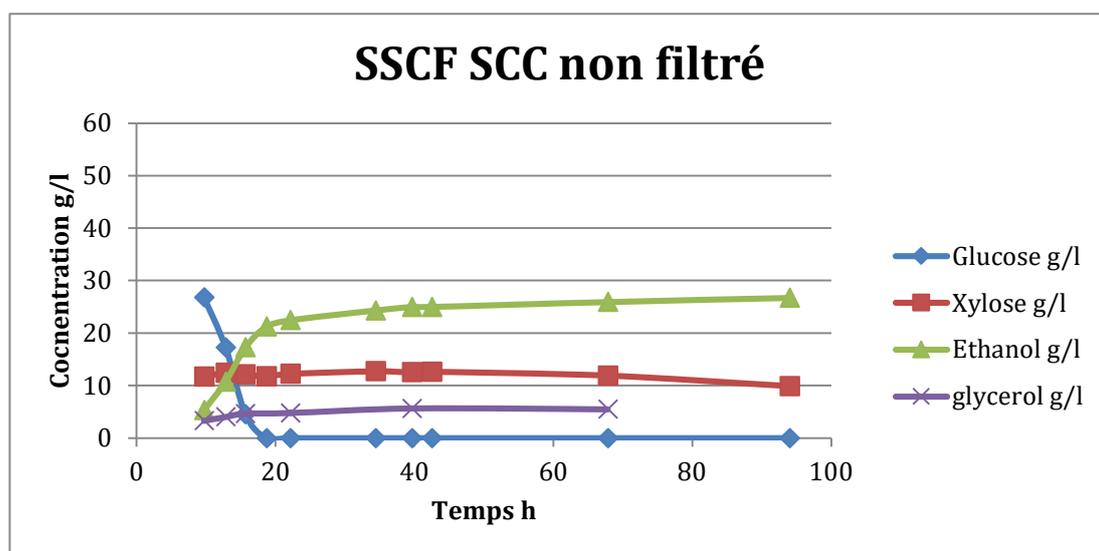


Figure 50. Résultats de SSCF avec du bioextrudat SCC prétraité sans filtration 22% de matières sèche.

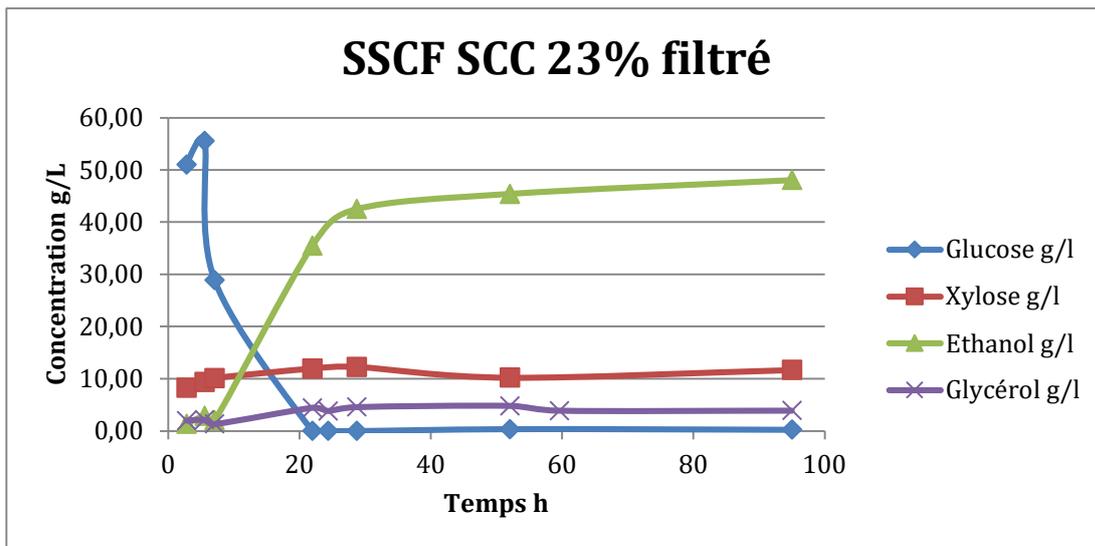


Figure 51. Résultats de SSCF avec du bioextrudat SCC prétraité avec filtration, 23% de matières sèche.

Il apparaît, que la filtration, en éliminant une grande partie de la matière minérale permet de grandement augmenter les performances globales du bioprocédé. La majorité de cette augmentation se produit pendant la phase de fermentation.

Tableau 13. Résultats de SSCF d'extrudât et bioextrudat prétraité avec ou sans filtration

SCC	Filtré	Non filtré
Taux de matière sèche % m/m	23	22
Concentration finale EtOH g/L	40	27
Xylose résiduel g/L	11	10
Xylose consommé %	60%	63%
Rendement éthanol (%rendement max) sucres consommés	91%	56%
Rendement éthanol (%rendement max)	83%	51%
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	214	141

Il semblerait donc que la filtration permet de réduire drastiquement la concentration de molécules inhibitrices de la fermentation par notre levure modèle Cellux 4, rendant le bioextrudat filtré beaucoup plus fermentescible que le non filtré. Le rendement éthanol de la matière prétraitée et filtré étant largement supérieur. Nous avons par la suite essayé de comprendre plus en détail les mécanismes impliqués.

5.1.2. Impact du taux de matières sèches

Nous l'avons vu précédemment, l'un des moyens les plus simples permettant de rendre le procédé plus efficace est de terminer la fermentation avec un taux d'éthanol élevé. Pour cela, il faut pouvoir fournir plus de sucres aux levures lors de la fermentation.

Une des solutions envisagées est donc d'augmenter la quantité de biomasse prétraitée dans le bioréacteur.

Mais ce faisant, l'augmentation du taux de matière sèche va entraîner de gros changements dans le comportement physique du moût qui va passer de l'état pâteux à l'état liquide au cours de sa déstructuration, amenant ainsi de nombreuses problématiques liées à la rhéologie et aux échanges matières.

Il est admis qu'un taux de matières sèches entre 10% et 20% est facilement hydrolysable et fermentescible, nous avons donc essayé d'augmenter cette valeur en vue d'évaluer son impact sur le comportement des biocatalyseurs (enzymes et levure) et si possible d'atteindre une meilleure production d'éthanol.

Nous avons effectué des tests comparatifs avec trois valeurs de matières sèches, 20%, 25% et 30%.

L'INPT nous a fourni un bioextrudat de SCC prétraité et filtré avec les meilleures conditions définies précédemment et infusé avec 15FPU de Cellic Ctec 2 par g d'extrudat.

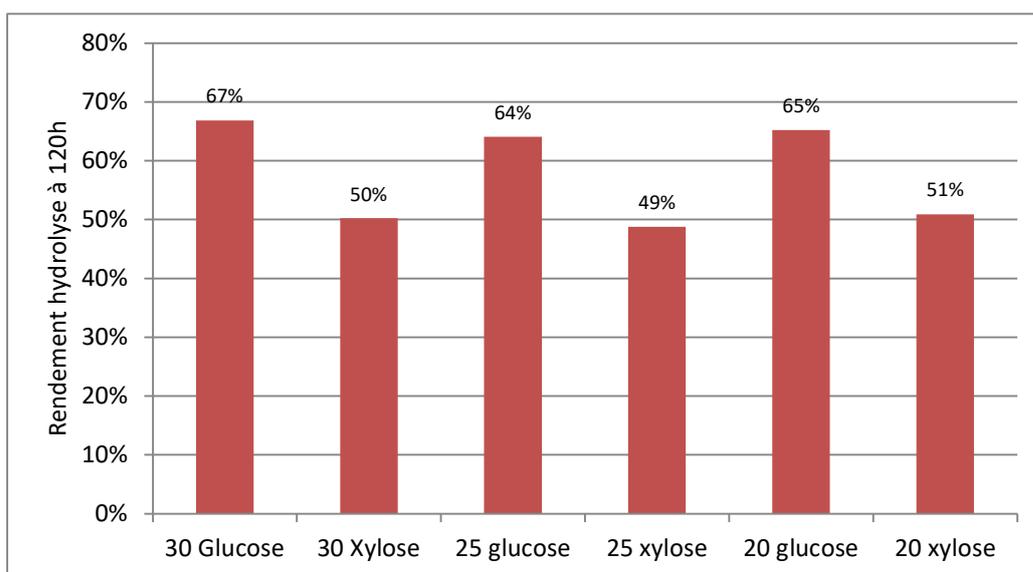


Figure 52. Comparaison des rendements d'hydrolyses à 120h de SCC à différents taux de matières sèches.

Pour nous assurer que l'effet observé n'était pas dû à une modification de la capacité enzymatique à hydrolyser l'extrudat, nous avons dilué ce bioextrudat avec de l'eau stérile pour atteindre des taux de matières sèches de 20%, 25% et 30% et nous avons effectué une hydrolyse de 120h. Les résultats de ces hydrolyses démontrent que le rendement d'hydrolyse final (120h) de ce bioextrudat est conservé aux différentes concentrations de matière sèche.

Nous avons par la suite effectué des expériences comparatives de fermentation, pour cela nous avons effectué une pré-hydrolyse de 24h avant d'inoculer avec CelluX 4 afin de s'affranchir d'une éventuelle limitation de la cinétique de libération des sucres pouvant impacter le comportement de la levure.

Nous avons conduit ces expériences de fermentation en bioréacteur de 5L.

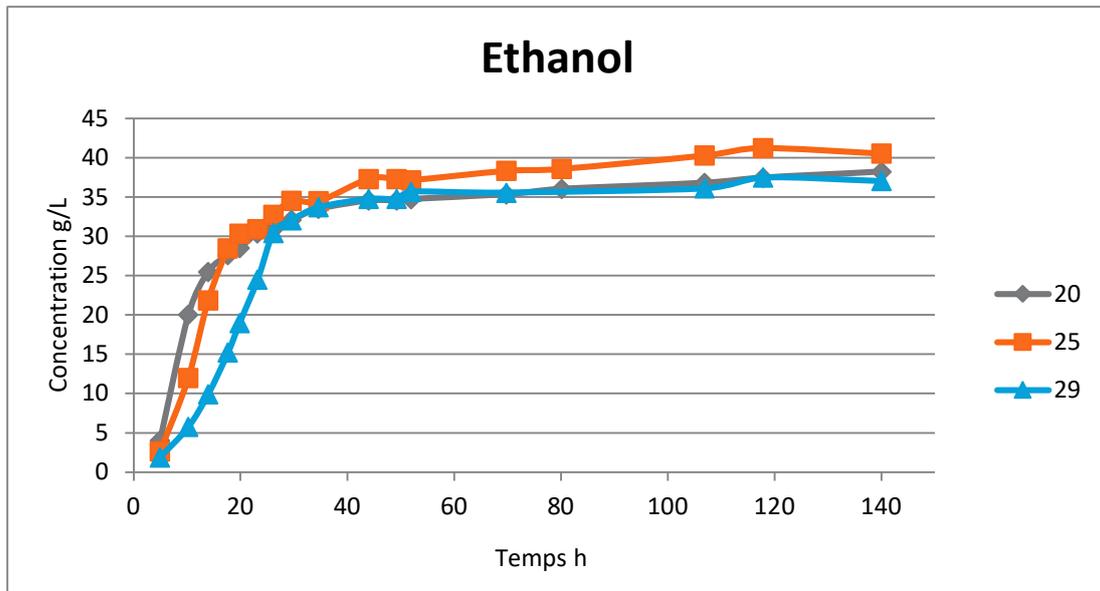


Figure 53. Concentration résiduelle d'éthanol au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèches (20%, 25%, 29%)

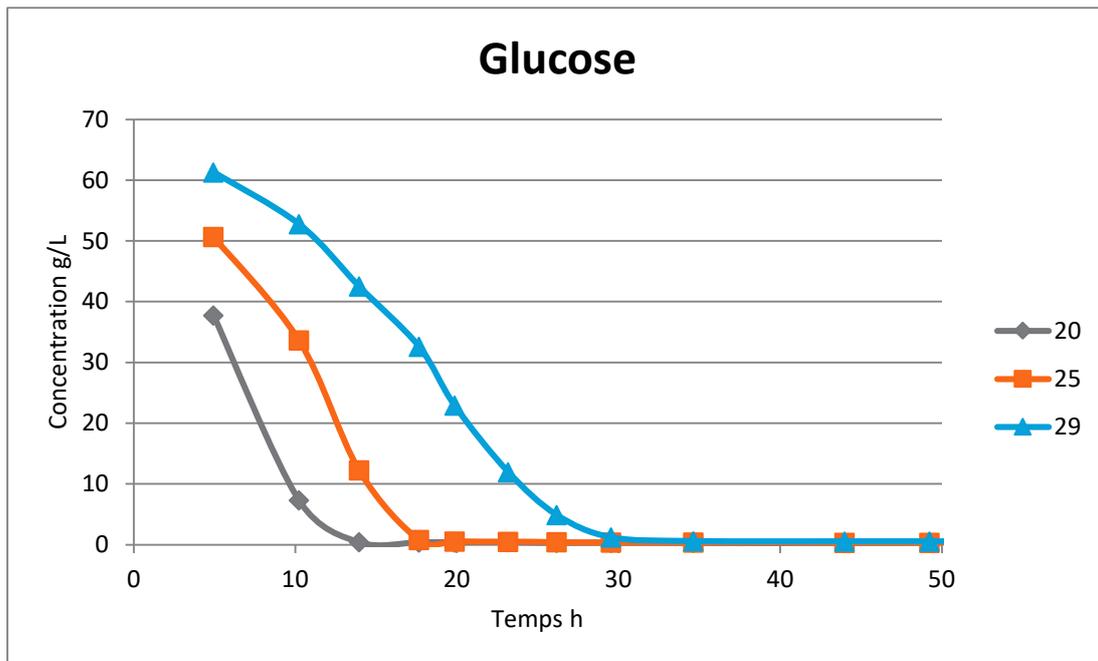


Figure 54. Concentration résiduelle de glucose au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèches (20%, 25%, 29%)

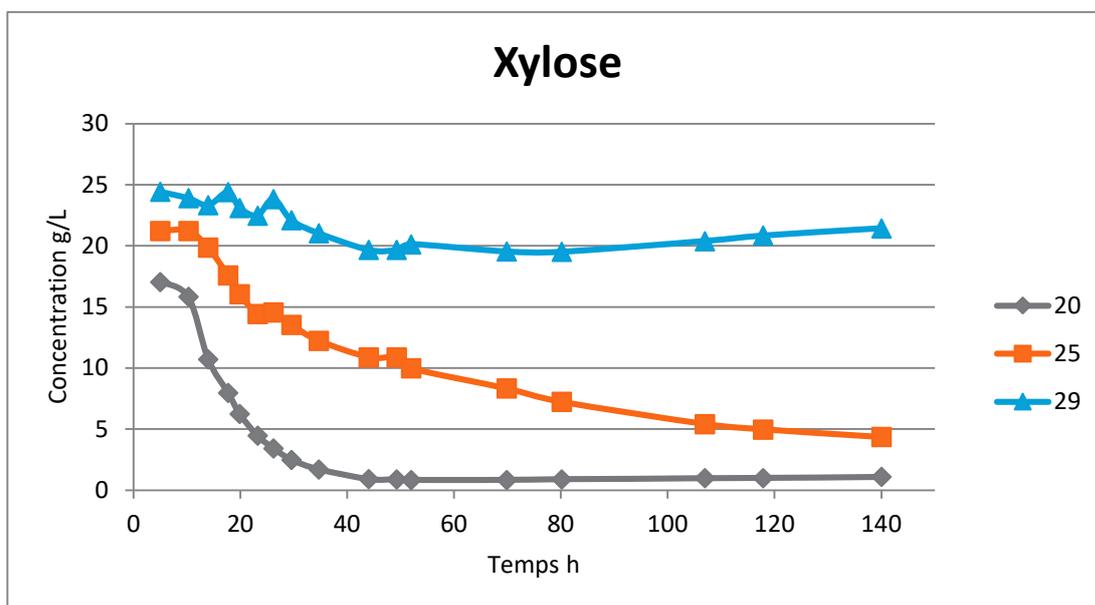


Figure 55. Concentration résiduelle de xylose au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèche (20%, 25%, 29%)

Tableau 14. Résultats expérimentaux de SSCF de SCC à différents taux de matières sèches

Taux de matières sèches %	20	25	29
Concentration finale EtOH g/L	38	41	37
Xylose résiduel g/L	1	4	21,5
Rendement en Litre/Tonne de biomasse	186	154	121
Xylose consommé	95%	84%	33%

L'analyse des résultats nous démontre que la concentration d'éthanol la plus élevée est obtenue à 25% de matières sèches, concentration légèrement plus élevée que celle obtenue à 20%.

Les meilleurs rendements de production en litres d'éthanol par tonne de biomasse sont en faveur de 20% de matières sèches.

En observant plus précisément les graphiques de consommation des sucres, on peut voir que la vitesse de consommation du glucose est inversement corrélée aux taux de matières sèches.

Il en est de même pour le xylose, et l'on peut remarquer que le taux résiduel de xylose à la fin de la fermentation est lui proportionnel à la concentration en matières sèches.

A 29% peu de xylose est consommé, seulement 33%, le résiduel est donc très fort (21.5g/L), impactant fortement le rendement de production d'éthanol.

A 25% plus de 80% du xylose a été consommé, à une vitesse plutôt lente.

A 20% la quasi-totalité du xylose est fermenté (95%), la vitesse de consommation du xylose est rapide, la totalité étant consommée dans les 40 heures suivant le début de la fermentation.

Dans la gamme étudiée ces résultats montrent ainsi, que plus le taux de matière sèche augmente, plus la production d'éthanol, et son rendement, sont négativement impactés. On remarque d'ailleurs que cette différence de production est en majorité causée par une très forte diminution de la consommation du xylose.

Au vu de l'absence d'effet significatif des hautes matières sur l'étape d'hydrolyse enzymatique, nous pouvons clairement conclure que les hauts taux en matières sèches ont un effet inhibiteur pour les levures *S. Cerevisiae*.

Cette conclusion a par la suite dirigé nos investigations vers la présence d'un ou plusieurs composés inhibiteurs dans le bioextrudat de SCC traité par extrusion bi-vis. Nous avons aussi analysé la concentration en glycérol produit par les levures au cours de ces fermentations, Il apparaît très clairement que la quantité de glycérol produit est directement corrélée avec la quantité de matières sèches présentes dans le milieu. Le glycérol étant le principal osmo-régulateur chez la levure, cela démontre la présence d'un stress cellulaire dont l'intensité est corrélée avec le taux de matières sèches. Plusieurs hypothèses peuvent être développées à partir de ces observations, l'accumulation de glycérol se faisant suite à des stress variés entraînant un choc osmotique. (Nevoigt & Stahl, 1997)(Aslankoochi et al., 2015)

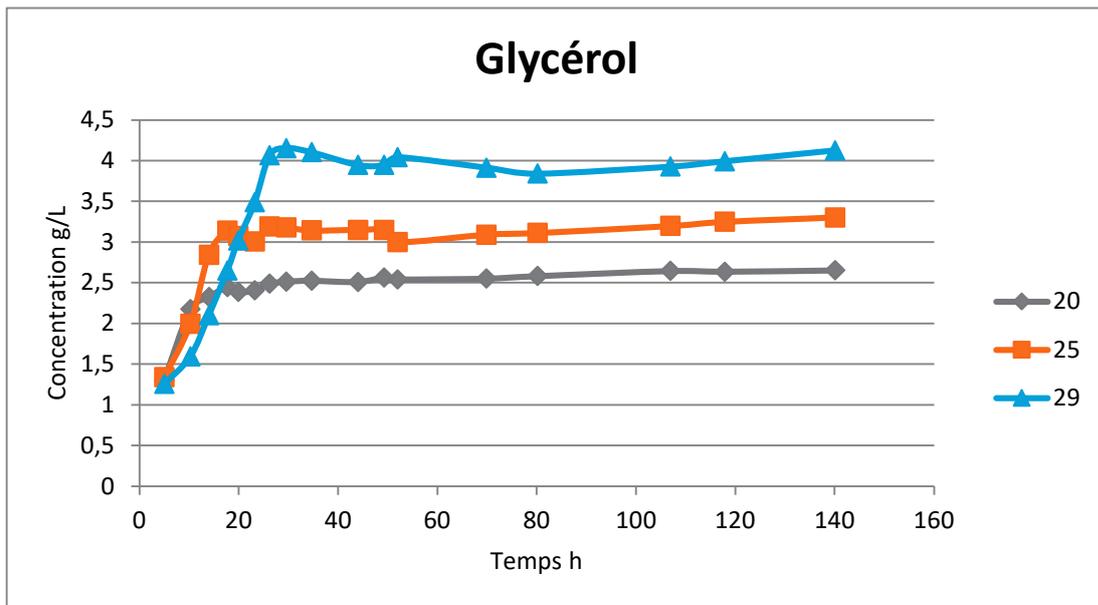


Figure 56. Concentration résiduelle de glycérol au cours d'une expérience en SSF de SCC à différents taux de matière sèche (20%, 25%, 29%)

Nous l'avons vu précédemment, nous avons pu démontrer que la filtration dans l'extrudeur était essentielle à une bonne fermentation mais avait peu d'impact sur l'hydrolyse enzymatique. Nous en avons conclu que des éléments indésirables se retrouvent dans l'extrudât après prétraitement et que ces éléments sont d'une manière ou d'une autre délétères au bon fonctionnement de *S. cerevisiae*.

Après analyse des bioextrudats et du filtrat récupéré après prétraitement, la quantité d'inhibiteurs classiques comme les phénols, le HMF et furfural est apparue assez faible (données non présentées).

Nous nous sommes donc orientés vers un rôle des sels provenant des solutions alcalines et acides durant le prétraitement.

Des dosages de concentrations des sels de sulfate ou de sodium ont été effectués et mis en évidence des concentrations élevées de sodium aux alentours de 0.15 molaire à 20% de biomasse prétraitée, et aux alentours de 0.04 molaire de sel de sulfate.

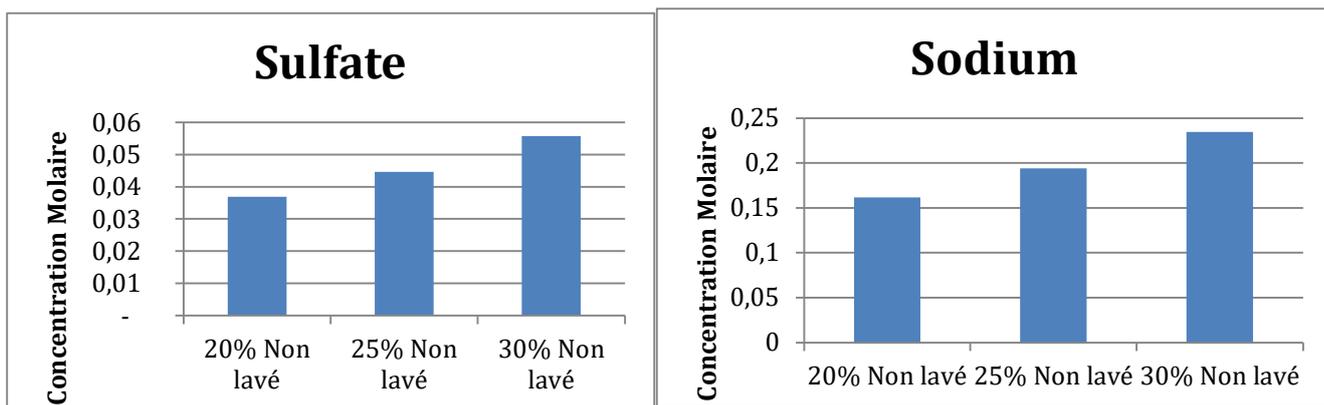


Figure 57. Concentration de sel de sulfate et de sodium dans les extrudats de Sweet Corn Cob prétraité à différents taux de matière sèches

L'analyse du filtrat a aussi permis de démontrer une présence forte de ces sels de sulfate et de sodium ce qui confirme qu'une forte proportion de ces sels de prétraitement sont éliminés par l'étape de filtration, la diminution de leurs concentrations étant donc probablement responsable de l'amélioration des performances éthanoliques après une étape de filtration.

5.1.3. Lavage des extrudâts

En vue de déterminer l'impact de ces sels issus de l'étape de prétraitement, nous avons décidé d'effectuer des essais comparatifs avec de la biomasse prétraité puis lavé.

Celle-ci a été lavée puis centrifugée pour en éliminer l'eau et les composés solubles.

Les concentrations en sels ont été déterminées à nouveau après lavage :

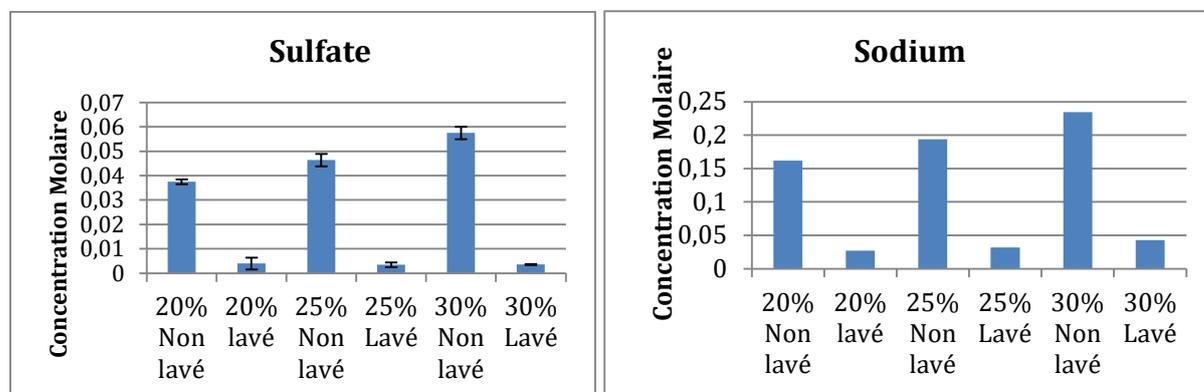


Figure 58. Comparaison des concentrations de sel de sulfate et de sodium dans les extrudats de Sweet Corn Cob prétraité et lavé ou non à différents taux de matière sèches

Nous avons pu démontrer que le lavage des extrudats permettait de réduire de 80% à 90% la concentration des sels issus du prétraitement dans la matière extrudée (SCC).

En vue d'observer un potentiel effet du lavage sur l'étape d'hydrolyse, nous avons mené des hydrolyses comparatives sur des extrudats lavés et non lavés à différents taux de matière sèche.

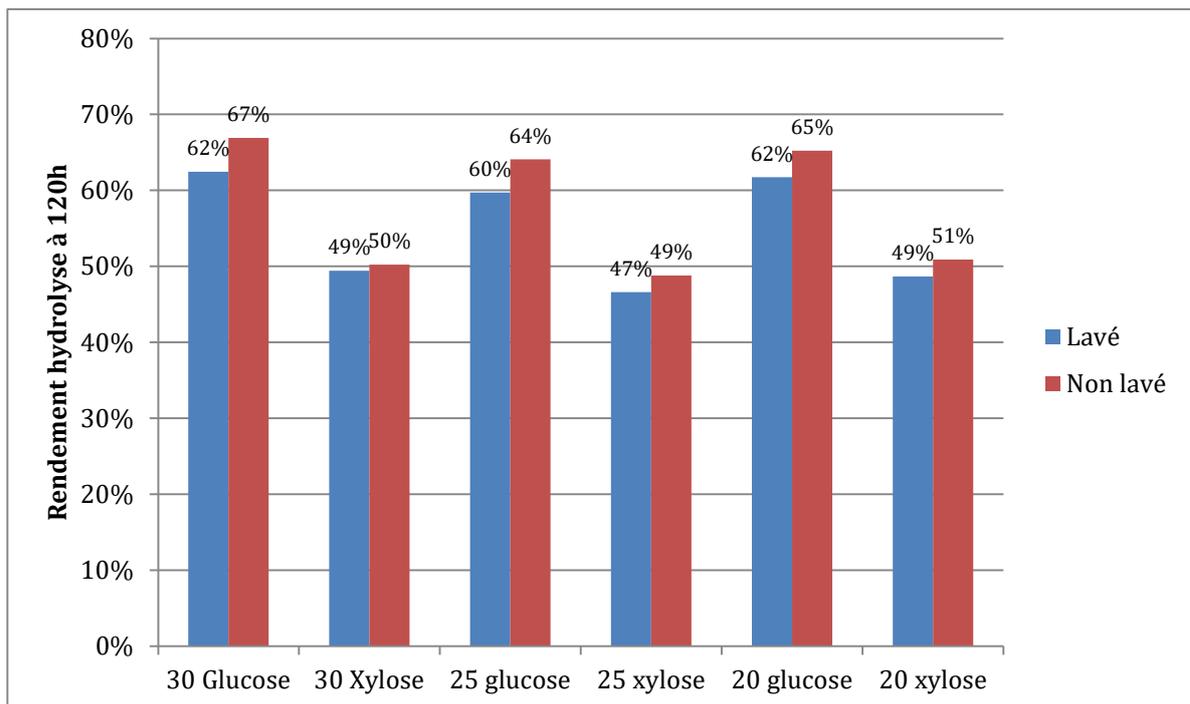


Figure 59. Rendement d'hydrolyse à 120h pour le glucose et xylose à partir de SCC prétraité, lavé ou non. A différents taux de matières sèches (20%, 25%, 30%). Comparatif entre extrudât lavé ou non.

Comme nous pouvons l'observer sur le graphique ci-dessus, il n'y a pas de différence significative entre l'hydrolyse d'un substrat lavé ou non lavé. Ainsi, les rendements d'hydrolyse à 120h sont très proches qu'elle que soit la teneur en matière sèche et indépendamment du lavage ou non des extrudats.

Par la suite, des expériences comparatives de fermentation ont été effectuées, encore une fois pour se départir des effets de l'hydrolyse, une pré-hydrolyse de 48h a été effectuée au préalable. Ces expériences ont donc été conduites en pré-hydrolyse de 48h suivie d'une SSCF.

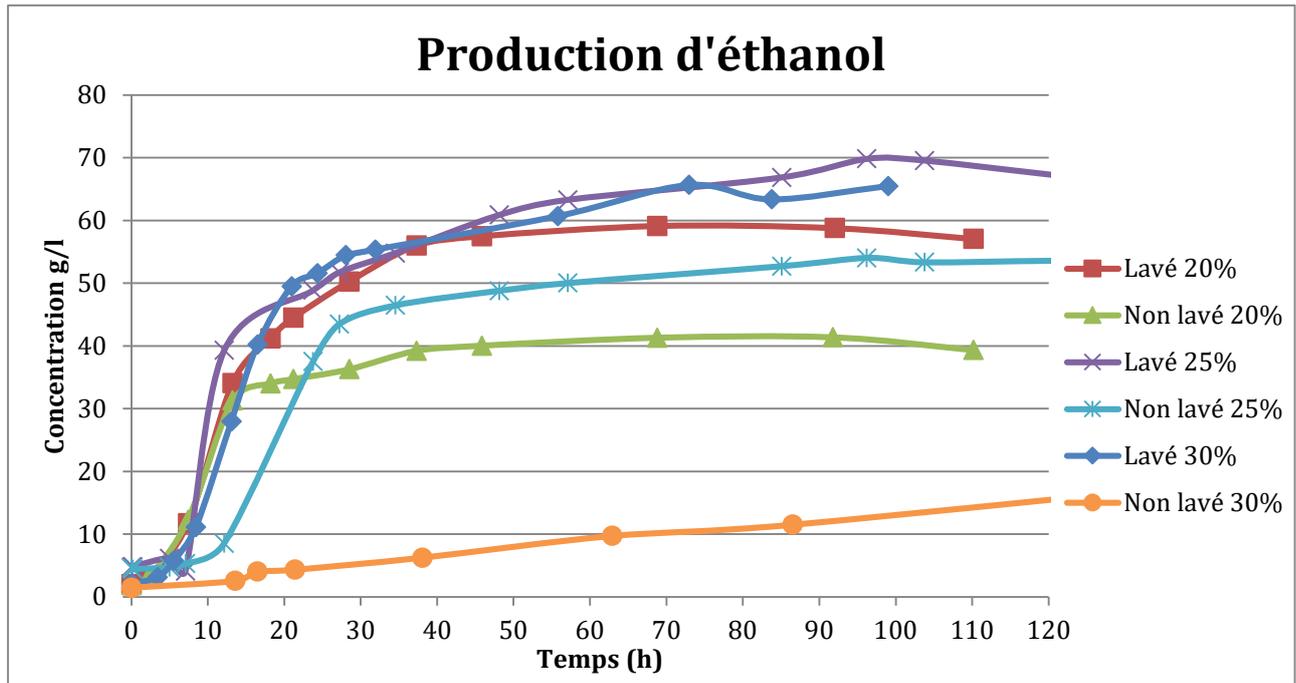


Figure 60. Production d'éthanol par CelluX 4 en SHF à partir SCC prétraité et lavé ou non à différents taux de matières sèches

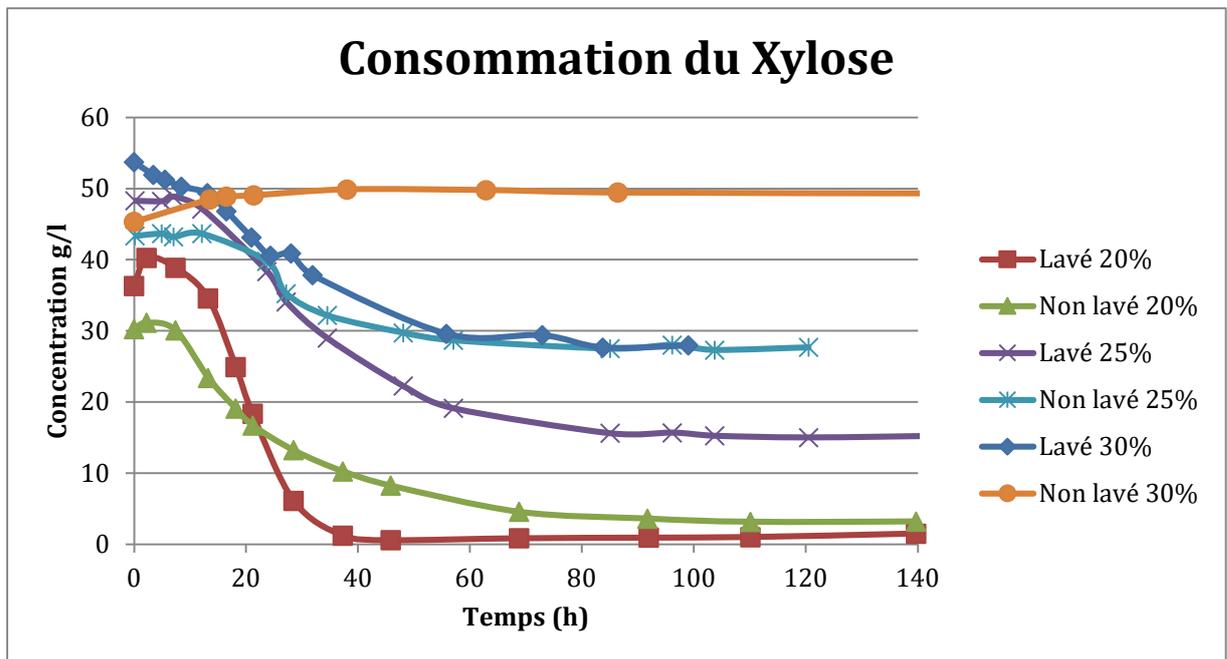


Figure 61. Consommation du Xylose par CelluX 4 en SHF à partir SCC prétraité et lavé ou non à différents taux de matières sèches

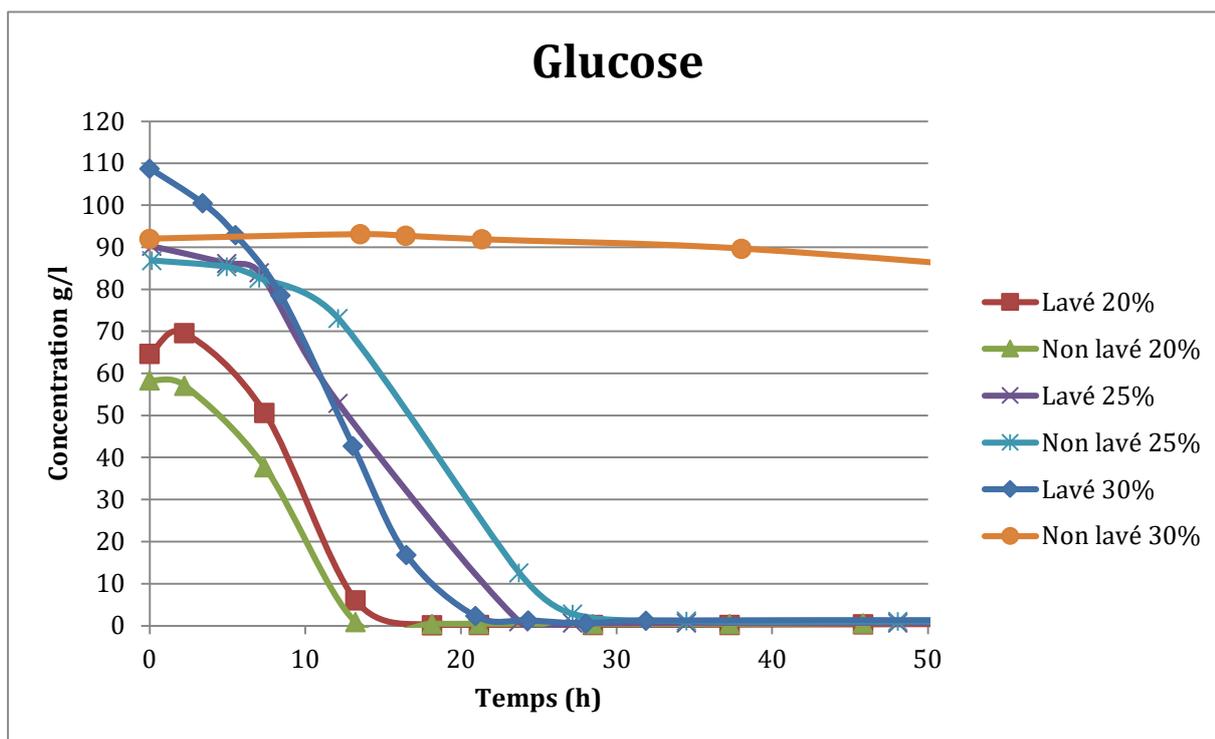


Figure 62. Consommation du glucose par CelluX 4 en SHF à partir SCC prétraité et lavé ou non à différents taux de matières sèches

Pour chaque couple lavé/non lavé, on observe une amélioration significative de la concentration finale en éthanol, de la vitesse de consommation du xylose et du xylose résiduel en faveur du lavage.

Tableau 15. Résultat d'expériences en SHF de SCC prétraité lavé ou non, à différentes concentration en matière sèches.

Taux de matières sèches/ Lavés ou non	20% Lavé	20% Non Lavé	25% Lavé	25% Non Lavé	30% Lavé	30% Non Lavé
Concentration finale EtOH g/L	53	43	69	54	70	47
Xylose résiduel g/L	1	3	15	28	31	47
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	270	229	254	222	204	159

Comme observé précédemment, l'augmentation du taux de matières sèches réduit le rendement final et augmente la quantité de xylose non consommé. Le lavage de la biomasse permet néanmoins une amélioration significative de tous

les facteurs observés, concentration finale en éthanol, xylose résiduel et rendement final.

Cette phase de lavage nous a permis d'atteindre des valeurs finales en éthanol très élevées, avec près de 70g/L en utilisant 25% de substrats lavés, valeurs encore jamais atteinte dans nos précédentes expériences.

Tableau 16. Résultats d'expériences en SHF de SCC prétraité lavé, à différentes concentration en matière sèches.

Taux de matières sèches/ Lavés ou non	20% Lavé	25% Lavé	30% Lavé
Concentration finale EtOH g/L	53	69	70
Xylose résiduel g/L	1	15	31
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	270	254	204

Cependant si on compare uniquement les 3 expériences avec de la biomasse lavé, on observe de meilleurs résultats avec le taux de matière sèche le plus faible.

Le résiduel de xylose est ainsi plus élevé à mesure que l'on augmente la teneur en matière sèche.

On peut donc conclure que les effets observés sur la consommation du xylose sont des effets multifactoriels, les sels du prétraitement présents dans le substrat prétraité jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la consommation du xylose par la levure Cellux 4, mais ce n'est pas le seul phénomène en jeu, comme ces résultats le démontrent.

5.2. Effet des sels sur le microorganisme

5.2.1. Expériences en flacon scellé

En vue de déterminer le rôle de différents sels sur la production d'éthanol par la levure CelluX 4, des essais en flacons scellés ont été menés.

Ces expériences ont été menées en SHF. Le moût à 20% de matières sèches a été inoculé par CelluX 4 après 48h d'hydrolyse enzymatique en Erlenmeyer, à 30°C et sous agitation. Etant donné que le mélange passif par agitation n'est pas aussi efficace que le mélange actif en bioréacteur, nous avons préféré attendre une liquéfaction totale du moût avant inoculation pour se départir d'une limitation induite par la cinétique d'hydrolyse et d'effets éventuels d'inhibition des levures par des mécanismes de changement rhéologique ou de stress osmotique.

Après cette phase d'hydrolyse, l'inoculation a eu lieu de façon concomitante avec l'addition de différentes concentrations de différents sels.

Pour des raisons évidentes de maintien du PH il ne nous était pas possible de rajouter de l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou de la soude ($NaOH$), nous avons donc ajouté différents sels de ces composés : phosphate de sodium (NaH_2PO_4), sulfate de sodium (Na_2SO_4), Sulfate de Potassium (K_2SO_4), phosphate de Potassium (KH_2PO_4) et chlorure de sodium ($NaCl$).

La cinétique de production d'éthanol a été suivie par pesée grâce à la perte de poids associée à l'émission de CO_2 lors de la production d'éthanol (1 mole produite de CO_2 par mole d'éthanol).

Après 72h de fermentation, les échantillons ont été collectés et analysés en HPLC pour déterminer la concentration résiduelle de glucose, xylose et éthanol, et ainsi de valider l'estimation de production obtenue par pesée.

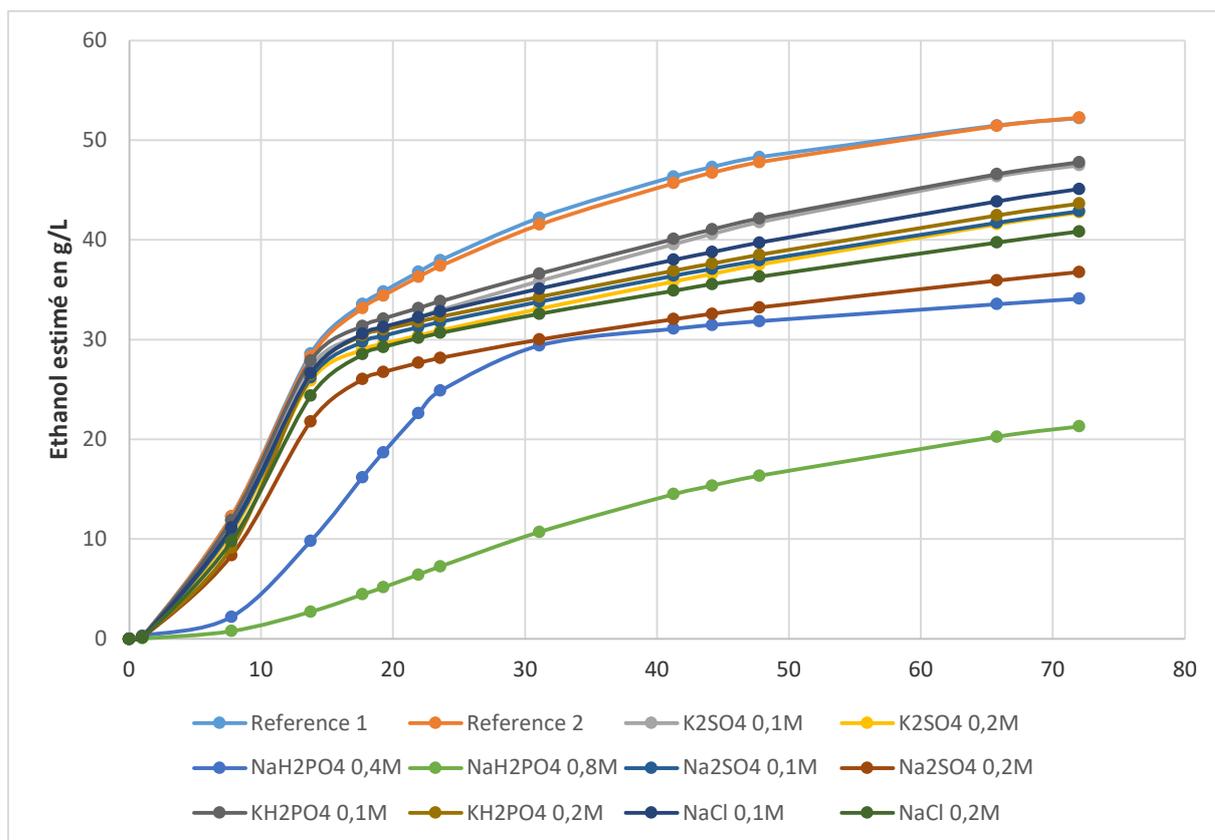


Figure 63. Ethanol produit en g/L, estimé par perte de poids, expériences en flacons scellés SHF de SCC à 20% en présence ou non de différents sels.

Tableau 17. Résultats obtenus par fermentation en flacons scellés de SCC pré-hydrolysé (48h) en présence de différents sels à différentes concentrations.

	% Xylose consommé	% ethanol produit/contrôle
K2SO4 0,1M	86%	92%
K2SO4 0,2M	62%	83%
NaH2PO4 0,4M	13%	66%
NaH2PO4 0,8M	n.c	41%
Na2SO4 0,1M	62%	83%
Na2SO4 0,2M	37%	71%
KH2PO4 0,1M	80%	93%
KH2PO4 0,2M	58%	85%
NaCl 0,1M	66%	87%
NaCl 0,2M	50%	79%

Nous pouvons observer que la moindre addition de sels perturbe le processus de fermentation en impactant plus ou moins la production d'éthanol et plus particulièrement la consommation du xylose. La consommation du glucose ne semble pas ou peu impactée, avec un résiduel de glucose nul ou presque dans chaque cas (excepté Na_2HPO_4 à 0.8M)

Dans le meilleurs des cas, en utilisant K_2SO_4 à 0.1M, la consommation de xylose est diminuée de 14% et la production d'éthanol de seulement 8% par rapport aux témoins.

Si l'on compare les différents sels utilisés entre eux et à des concentrations similaires (0.1M, 0.2M) on peut observer que les changements les plus drastiques sont ceux obtenus avec des sels de sodium, Na_2SO_4 et NaCl . Les résultats obtenus avec des sels de phosphate KH_2PO_4 ou de sulfate K_2SO_4 sont en moyenne meilleurs, avec une plus faible diminution de la production d'éthanol.

Il semblerait donc que le cation sodium ait un impact plus fort que les autres ions et cet effet est drastique à de fortes molarités comme le démontre la fermentation très lente obtenue avec 0.8M de NaH_2PO_4 .

Ces essais valident donc les travaux obtenus par E. Casey et al., 2013, ainsi que nos propres théories sur le rôle des sels dans la consommation de xylose avec CelluX 4.

Il apparaît que l'utilisation de potasse en lieu et place de la soude lors du prétraitement puisse être un facteur permettant d'améliorer la fermentation du xylose à haute teneur en matières sèches. Nous avons émis des recommandations allant dans ce sens au groupe de travail de Babetreal 5, la décision définitive devra être validée en prenant en compte le contexte économique, l'efficacité du prétraitement et le coût environnemental de ce changement.

5.2.2. Chemostat

En vue d'étudier plus en détail le rôle de ces sels sur le métabolisme de la levure CelluX 4, nous avons mené des expériences en culture de type chemostat sur milieu minimum avec la levure Cellux 4 et en présence de glucose et xylose en tant que substrats.

Le chemostat est effectué dans un bioréacteur Sartorius B-DCU monitoré de 2L de volume utile, rempli avec un litre de milieu minéral. Nous avons utilisé un milieu minéral tel que décrit dans le Chapitre 3, nous avons juste changé les concentrations initiales des sucres en amenant 20 g/litre de glucose et 10 g/litre de xylose.

Un régime permanent est atteint, avec des concentrations résiduelles de glucose et de xylose quasi nulles, en utilisant un taux de dilution proche de 0,095 h⁻¹, soit un débit d'alimentation de 95ml/h. Ce régime permanent est atteint successivement avec 3 milieux de cultures différents, un milieu normal, un milieu comprenant 0,2 Molaire de sodium sous forme saline NaH₂PO₄ ou un milieu comprenant 0,2 Molaire de sulfate sous forme saline (NH₄)₂SO₄. Les paramètres de ces phases stationnaires sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 18. Paramètres du chemostat lors des régimes permanents selon le milieu utilisé.

	DO 600nm	Biomasse g/l	Glucose g/l	Xylose g/l	Glycérol g/L	Eth g/l
Milieu normal	1,326	2,32	0,0	0,8	1,6	12,4
Milieu Sodium	1,162	2,03	0,0	1,4	2,0	12,0
Milieu sulfate	1,148	2,01	0,0	1,5	2,5	12,7

	Glucose consommé g	Xylose consommé g	Sucres consommés g	Rendement éthanol g/g	Rendement Glycérol g/g	Rendement biomasse g/g	Rendement glycérol /biomasse g/g
Milieu normal	20,0	9,2	29,2	0,43	0,06	0,08	0,71
Milieu Sodium	20,0	8,6	28,6	0,42	0,07	0,07	1,01
Milieu sulfate	20,0	8,5	28,5	0,45	0,09	0,07	1,23

La première observation que nous pouvons faire, est que la concentration résiduelle de xylose est plus élevée en présence de 0,2 Molaire de sels de sodium ou de sulfate, 1,4g/L en présence de sodium et 1,5g/L en présence de sulfate et 0,85g/L sans sels.

La biomasse est elle aussi réduite en présence des sels, passant de 2,3g/L en milieu minimum à 2g/L en présence de sels.

On peut aussi remarquer une forte accumulation de glycérol en présence des sels, et encore une fois l'impact semble plus important en présence de 0,2Molaire de

sulfate, avec une production de 2,5g/L de glycérol contre 2g/L en présence de sodium et seulement 1,6g/L dans un milieu sans sels ajoutés.

Après stabilisation de la culture (5 temps de séjour, soit 50h), des pulses monitorées de xylose 2g/L ou de glucose (2g/L) + xylose (2g/L) sont effectués et l'évolution de la concentration de glucose et xylose est suivie par HPLC.

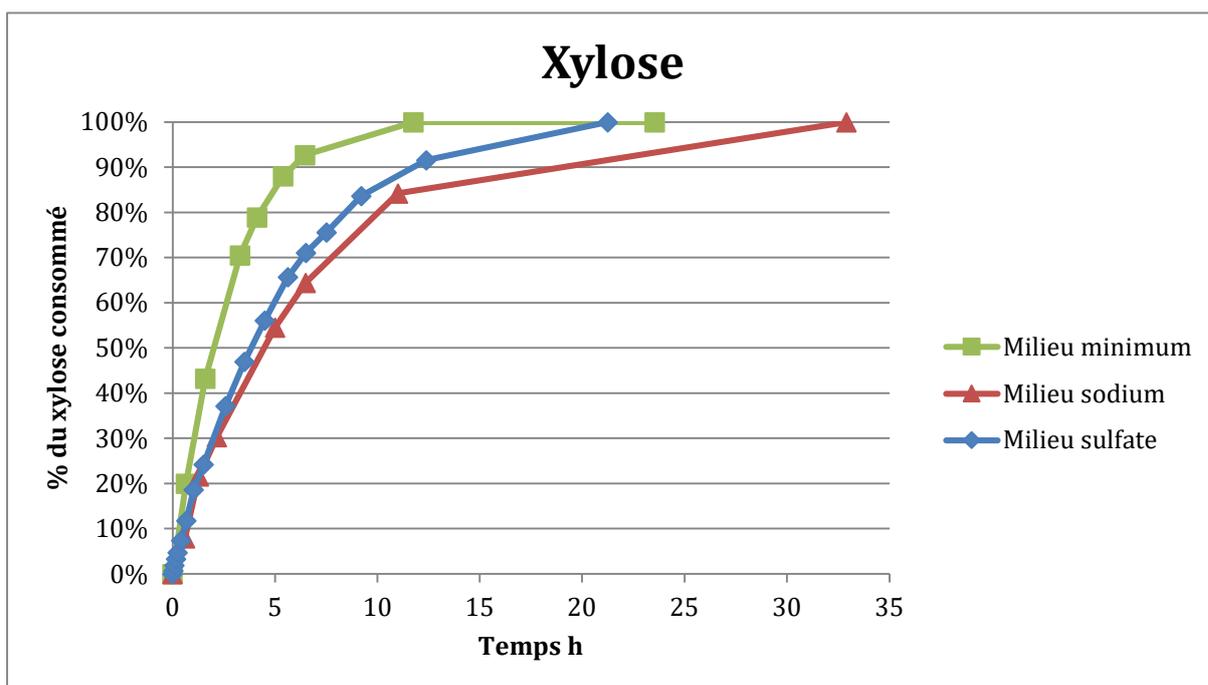


Figure 64. Consommation en pourcentage du xylose ajoutée lors d'un ajout dosé de xylose 2g/l (100% = 2g/l)

Si on regarde le pourcentage de consommation du delta de xylose au cours du temps, on peut remarquer que la vitesse de consommation est plus rapide dans le milieu de culture exempt de sels. On peut aussi remarquer que pour une même concentration (0,2Molaire) de sels, il semble que le sodium a un effet plus prononcé sur la consommation du xylose. Le retour à l'état stationnaire est atteint aux alentours de 10h dans le milieu sans sels, aux alentours de 20h en présence de sel de sulfate et aux alentours de 25-30h pour le milieu contenant du sodium.

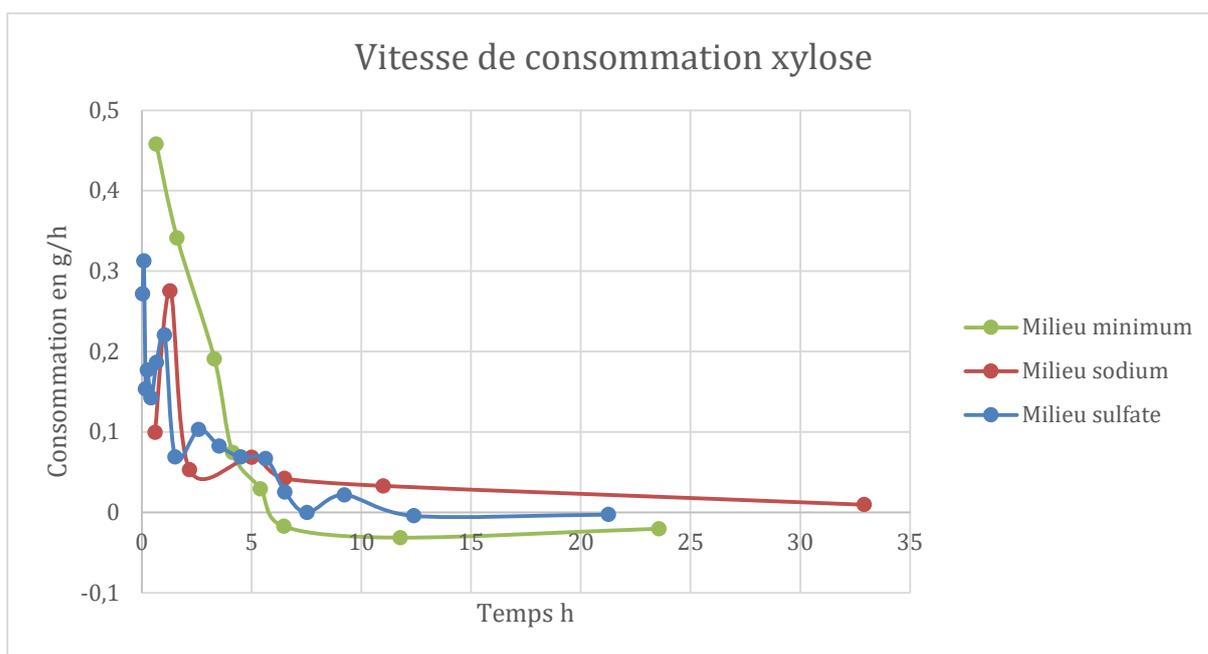


Figure 65. Vitesse de consommation du xylose selon le milieu utilisé lors d'un pulse de 2g/L de xylose.

La courbe de vitesse de consommation nous permet de valider qu'en milieu minimum sans sels supplémentaires, la levure Cellux 4 est plus apte à consommer rapidement le xylose, avec une vitesse max en début de pulse aux alentours de 0,45g/L/h

Le profil de vitesse de consommation en milieu sulfate ou sodium semble assez similaire en début de fermentation avec peut-être un faible avantage du milieu sulfate. Ces vitesses de consommation sont significativement plus faibles que celles observés avec du milieu minimum sans sels. La vitesse maximum de consommation se situant autour de 0,25g/L/h.

Lors des pulses de sucres comprenant glucose et xylose, les cinétiques de consommation de ces sucres sont assez similaires à celles observées avec du xylose seul.

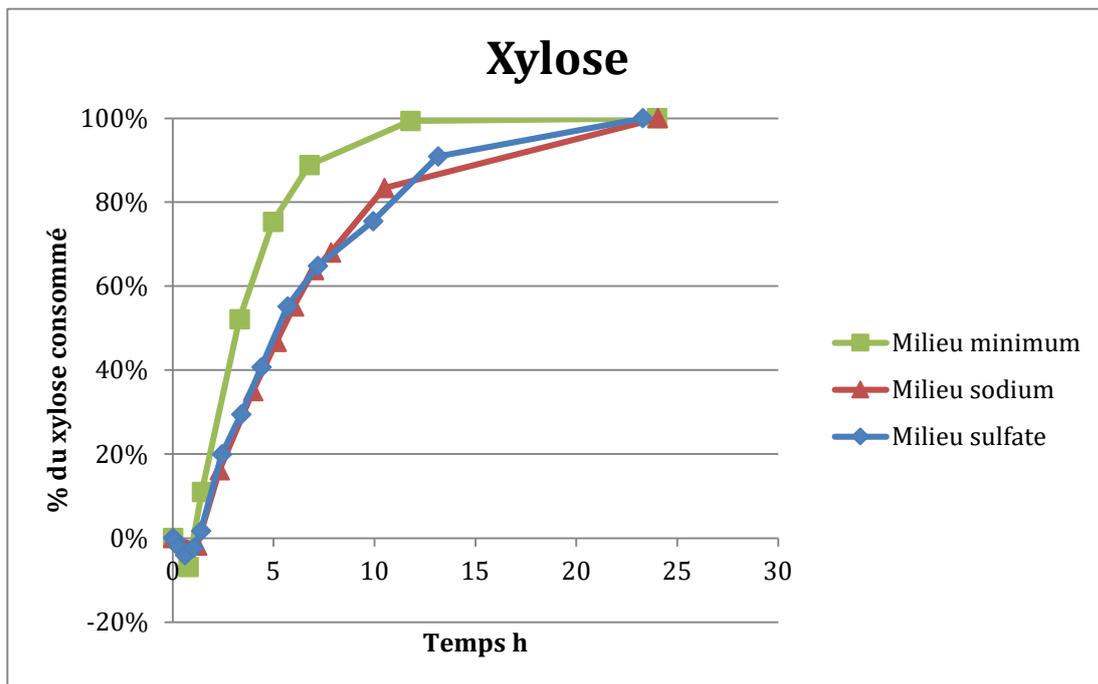


Figure 66. Consommation en pourcentage du xylose ajoutée lors d'un ajout dosé de 2g/l de xylose et 2g/l de glucose (100% = 2g/l)

La consommation du glucose est fidèle à nos attentes, tout le delta de glucose (2g/L) est consommé très rapidement par CelluX 4 (moins d'une heure et demie, résultats non fournis). La cinétique de consommation du xylose est quant à elle, très proche de celle observée avec les pulses de xylose seul.

On peut toutefois observer une non-consommation du xylose tant que le glucose n'est pas entièrement consommé, on note donc un retard avec accumulation de xylose le temps que le résiduel du glucose arrive à zéro. Cela démontre que le xylose n'est pas consommé en présence de glucose, ce qui se traduit par une accumulation du xylose présent dans le milieu minimum et qui en temps normal était consommé par les levures.

Si l'on regarde la consommation du xylose en pourcentage du delta, on remarque bien ce retard de consommation au début avec un bref passage en négatif du à l'accumulation du xylose du milieu. Dès que le glucose est entièrement consommé, le xylose commence à être consommé, avec une rapidité accrue dans le milieu ne contenant pas de sels complémentaires. Pour les échantillons contenant du sulfate et du sodium, les résultats semblent tout à fait similaires et ne démontrent que peu de différences entre les deux conditions.

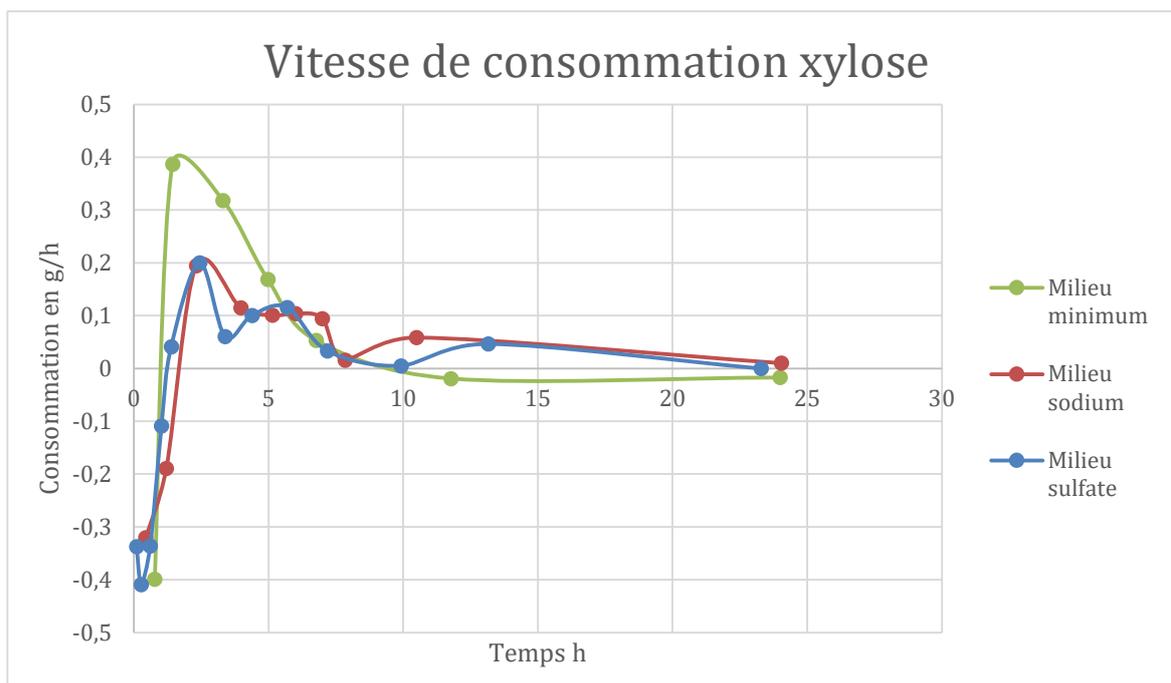


Figure 67. Vitesse de consommation du xylose selon le milieu utilisé lors d'un pulse de 2g/L de xylose et de 2g/L de glucose.

La courbe de vitesse de consommation du xylose montre plus précisément que cette vitesse de consommation négative repart à la hausse dès lors que le glucose a disparu du milieu. Encore une fois la vitesse la plus élevée de consommation est atteinte par la levure Cellux 4 en absence de sels, avec un maximum à 0,4 g/L/h, un petit peu moins que la vitesse observée lors d'un pulse de xylose uniquement. L'effet diauxique observé ici ne semble pas être dépendant de la présence de sels puisqu'on l'observe aussi en absence de sel, celui-ci est-il dû à une répression catabolique ou à un autre mécanisme ?

Les vitesses de consommation en présence de sulfate ou de sodium semblent ici aussi très similaires mais sont inférieures aux vitesses observées sans sels, avec un maximum à 0,2 g/L/h seulement.

Il apparaît donc que les sels de sodium et sulfate ont un impact important sur la levure *S. cerevisiae* CelluX 4. Leurs présences, même en faible quantité (0,2 molaire), induit une forte diminution de la vitesse de consommation du xylose, mais pas du glucose.

De nombreuses études ont démontré un rôle inhibiteur des sels sur le taux de croissance, la consommation du glucose et la production d'éthanol, mais cet effet

délétère était observé à des concentrations plus élevées de sels (0,5 molaire). Dans cette étude nous avons pu valider les observations de Casey et al (2013), et nous avons pu démontrer que de plus faibles concentrations de sels (0.2 molaire) suffisaient pour réduire drastiquement la consommation du xylose par une levure *S. cerevisiae* modifiée génétiquement pour exprimer la Xylose Isomérase (XI). A des concentrations aussi basses de sels, l'effet inhibiteur sur la consommation de glucose est pratiquement absent, il en va de même pour la réduction du taux de croissance pour laquelle nous n'avons pas trouvé d'effet significatif. La présence accrue de glycérol extracellulaire en présence des sels laisse à penser que les levures sont confrontées à un stress osmotique même à de faibles concentrations de sels.

5.3. Impact de la conduite du procédé sur la consommation du xylose et la production d'éthanol

5.3.1. Fedbatch

Les caractéristiques intrinsèques du prétraitement par extrusion permettent à celui-ci de traiter de la biomasse en continu avec un flux de matières important. En vue de profiter de cet avantage, il nous est apparu essentiel de tester une conduite de procédé en Fed-batch, permettant ainsi de remplir un ou plusieurs bioréacteurs de façon séquentielle sans arrêter l'extrudeur.

Nous avons testé ce type de conduite dans nos installations de l'INSA Toulouse à l'échelle laboratoire.

Durant la phase d'hydrolyse, la matrice, évolue d'un dépôt de solide hétérogène au début à l'obtention d'un moût visqueux dont la consistance va évoluer au cours de l'hydrolyse enzymatique. Une liquéfaction finit par se produire au bout de plusieurs heures, au fur et à mesure de la dépolymérisation de la structure de la biomasse.

Cette dynamique peut rapidement être limitante en termes de mélange et de transfert de flux à mesure que le taux de matières sèches augmente dans le bioréacteur.

Il est donc important de déterminer à quelle valeur critique de taux d'insoluble la réaction se retrouve bloquée/limitée par des problèmes d'hétérogénéité de mélange.

En contrôlant l'apport de biomasse dans le réacteur au cours du temps, nous espérons pouvoir viser des taux en matière sèche très élevés tout en restant en dessous de ce seuil critique d'insoluble dans le moût et en conservant le plus possible une solubilisation efficace et donc un moût liquide et homogène. Pour cela nous avons utilisé une installation composée d'un bioréacteur instrumenté de 15L connecté directement à un mini extrudeur bi-vis qui nous sert uniquement à convoier, de manière contrôlée, l'extrudat prétraité.



Figure 68. Photographie de l'équipement utilisé pour les expériences en Fed Batch

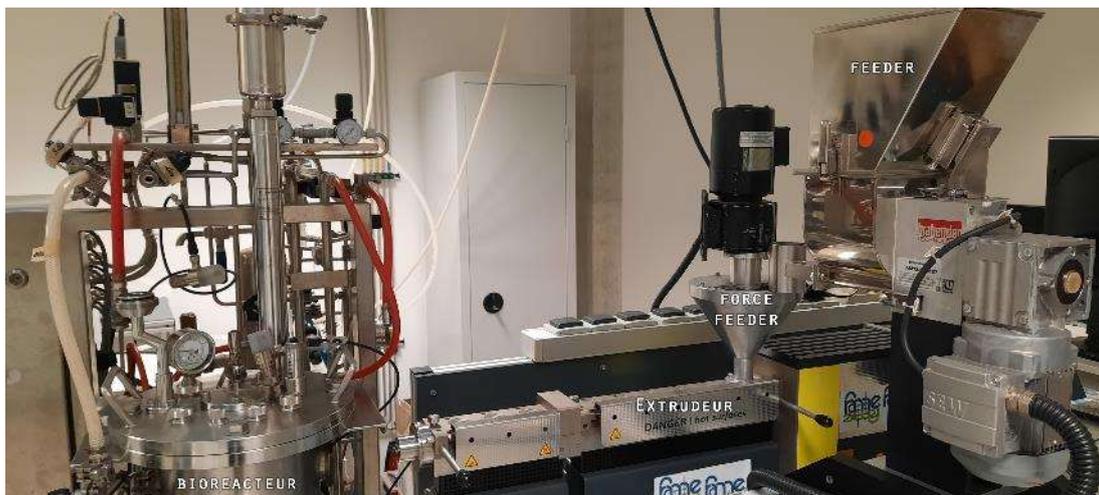


Figure 69. Plan rapproché de l'équipement utilisé pour les expériences en Fed Batch. Un feeder posé sur une balance est utilisé pour mesurer les quantités d'extrudat qui sont envoyées dans l'extrudeur. Ce substrat passe ensuite dans un force feeder à vis qui permet de remplir efficacement l'extrudeur bi-vis pour avoir un apport de matière continu.

Après une phase de mise au point et de calibration pour arriver à définir les paramètres adaptés à la vitesse d'alimentation que nous visons, plusieurs expériences ont été conduites.

Pour les premières expériences, nous avons visé un taux de matières sèches élevé, le but étant d'augmenter au maximum le taux de matières sèches sans atteindre les limites observées lors des expériences en laboratoire.

Nous avons donc amené le taux de matières sèches aux alentours de 33% en 48h. La conduite en Fed-batch nous a permis de conserver le moût sous forme liquide tout au long de l'expérience sans rencontrer de problème de mélange comme c'est le cas lors de nos expériences en conduite batch.

Ce procédé en Fed-batch nous a permis d'atteindre une concentration finale en éthanol très élevée, avec presque 60g/L en 40 heures.

En contrepartie, le rendement de production d'éthanol par tonne de biomasse est seulement de 185 litres, ce qui est similaire aux premiers résultats obtenus à des taux de matières sèches de 20%.

Le taux de matières sèches visé nous semble trop optimiste. En effet on observe une accumulation de glucose (résiduel à 25g/L) et de xylose (résiduel à 30g/L) à partir de 24h. Cela est le signe d'une inhibition de la fermentation et donc d'une diminution de la vitesse de consommation des sucres. Diminution de la vitesse de consommation qui peut aller jusqu'à un arrêt total de la fermentation se traduisant par une forte accumulation de sucres résiduelle dans le moût.

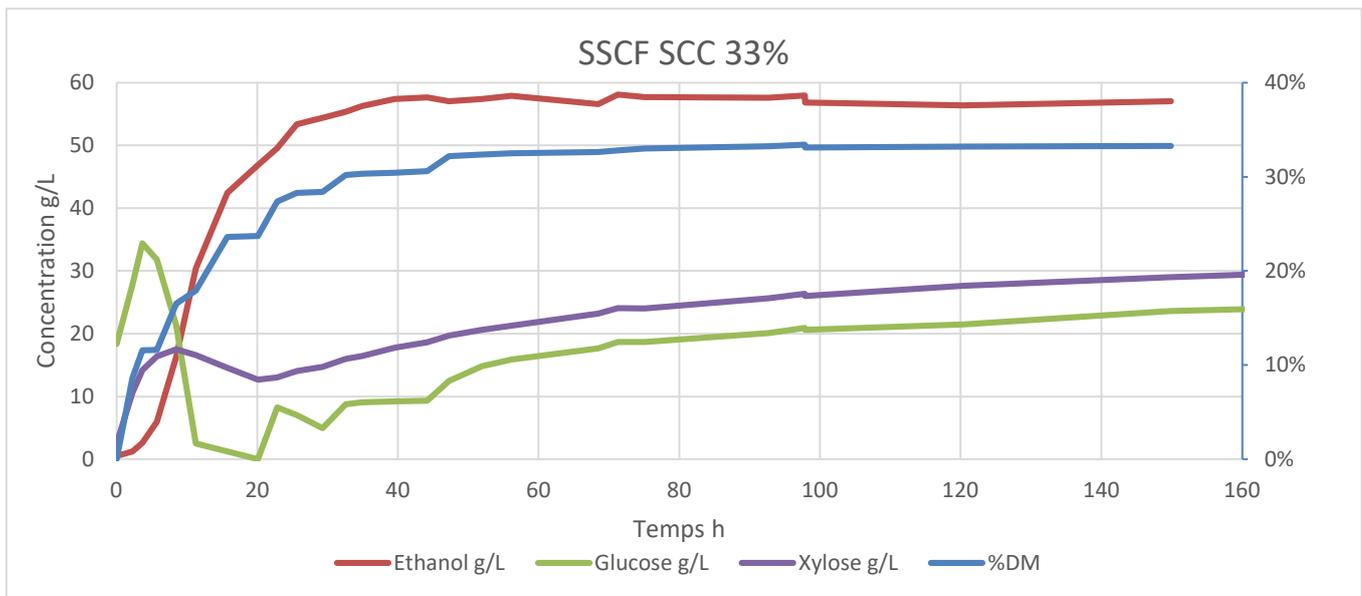


Figure 70. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.

En vue de limiter l'accumulation des sucres dans le moût, nous avons essayé de viser un taux de matières sèches un peu plus bas, 31%. La cinétique d'ajout de la biomasse se déroule sur 48h à l'instar de l'expérience précédente.

Comme précédemment, les résultats en production d'éthanol sont élevés avec une concentration finale à 55g/L. Malgré cela nous observons encore une accumulation significative de sucres non consommés, glucose (12.5g/L) et xylose (18g/L), en concentration résiduelle plus faible que dans l'expérience précédente néanmoins. Le rendement d'éthanol obtenu est équivalent à l'expérience précédente, avec 186 litres d'éthanol produit par tonne de biomasse utilisée.

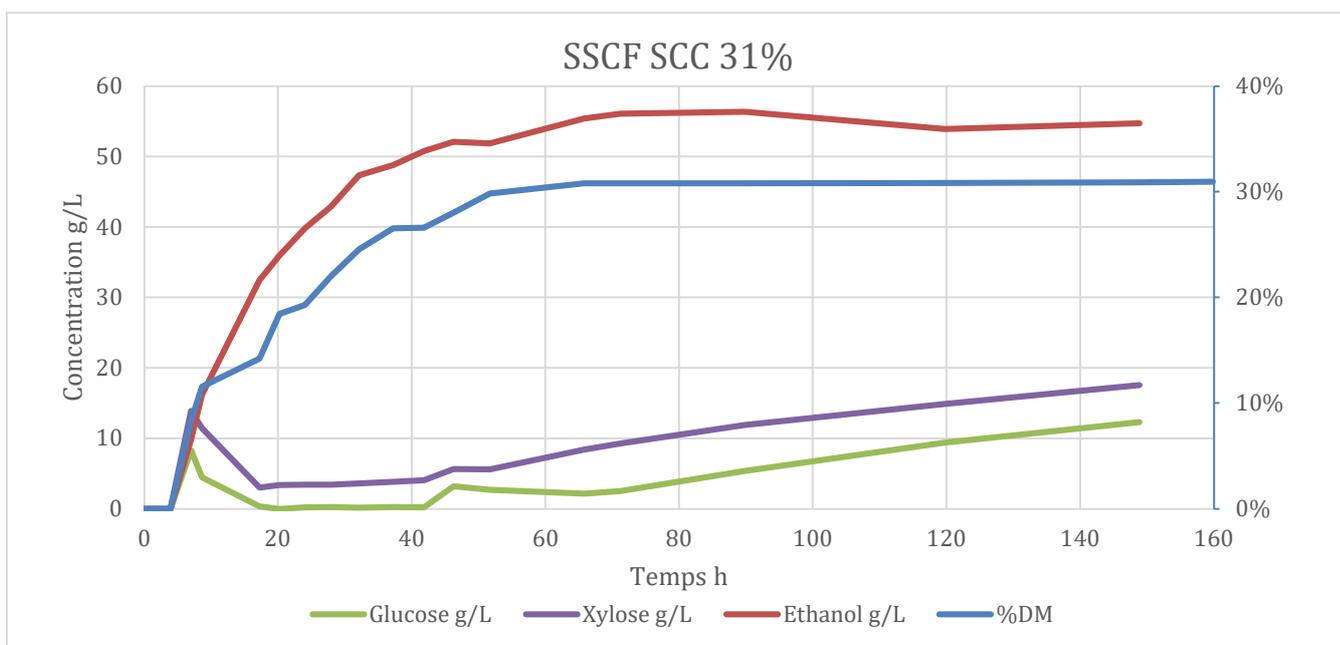


Figure 71. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.

Toujours en vue d'augmenter les performances et de limiter l'accumulation des sucres, nous avons cette fois visé seulement 28% de matières sèches dans le moût. Il a aussi été décidé d'augmenter la vitesse de l'apport en biomasse et d'atteindre la concentration en matières sèches finale au bout de seulement 24h

pour profiter des phases précoces où la levure est en condition optimale pour la fermentation.

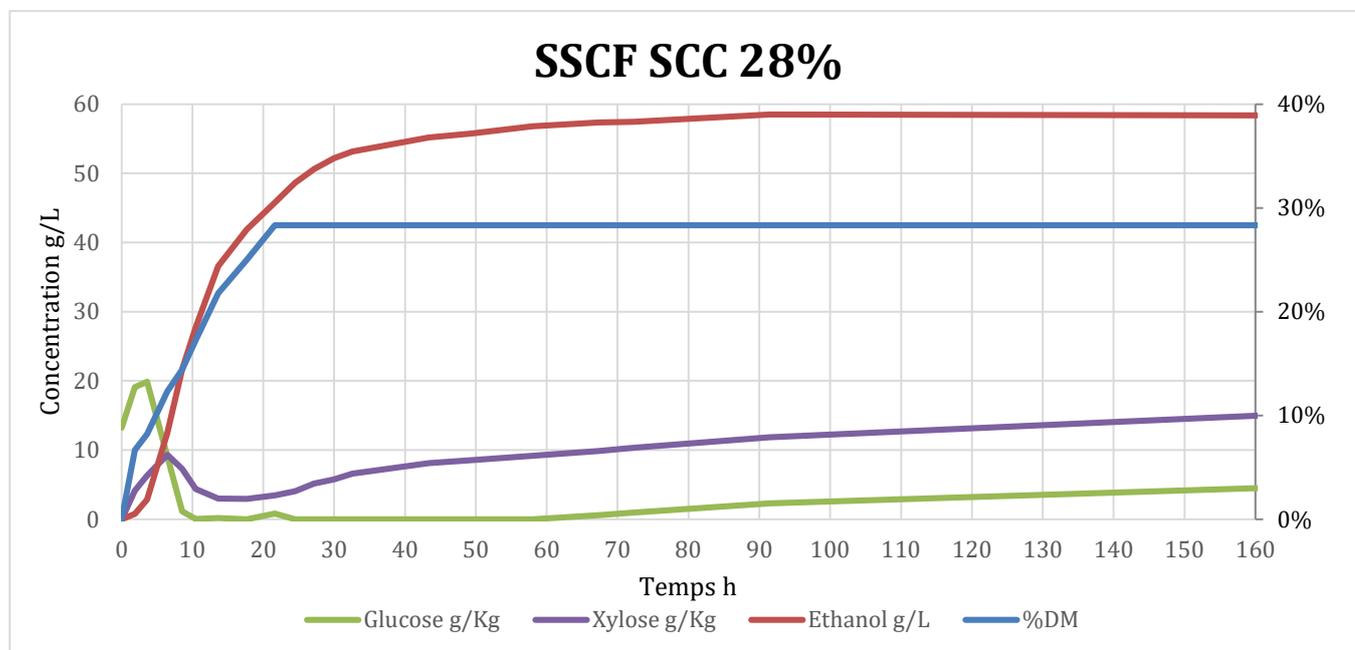


Figure 72. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps.

Les résultats obtenus sont à la hauteur de nos attentes, avec une production d'éthanol élevée à une concentration finale à 58.5g/L.

La diminution du taux de matières sèches et l'apport en seulement 24h ont permis de grandement réduire l'accumulation des sucres. Le xylose est bien consommé, même si on peut observer une accumulation qui commence à partir de 24h de culture. Le résiduel reste assez peu élevé avec 15g/L en fin de fermentation.

Le glucose est quant à lui entièrement consommé à mesure qu'il est produit, et ce jusqu'à environ 65/70h de fermentation, temps auquel on commence à observer une petite accumulation ce qui relate une diminution de l'activité des levures. Diminution pouvant traduire une décélération de l'activité de fermentation induite par l'action d'inhibiteurs et notamment la présence d'éthanol en quantité élevée.

Le rendement éthanol final est de 212 litres d'éthanol produit par tonne de biomasse utilisée.

Une dernière expérience a été menée en utilisant de la biomasse lavée par nos soins en vue d'éliminer les résidus de sels provenant du prétraitement.

Nous avons décidé de ne viser que 25% de taux de matières sèches dans le mout et, conformément aux résultats précédents, d'amener la biomasse lors des premières 24h.

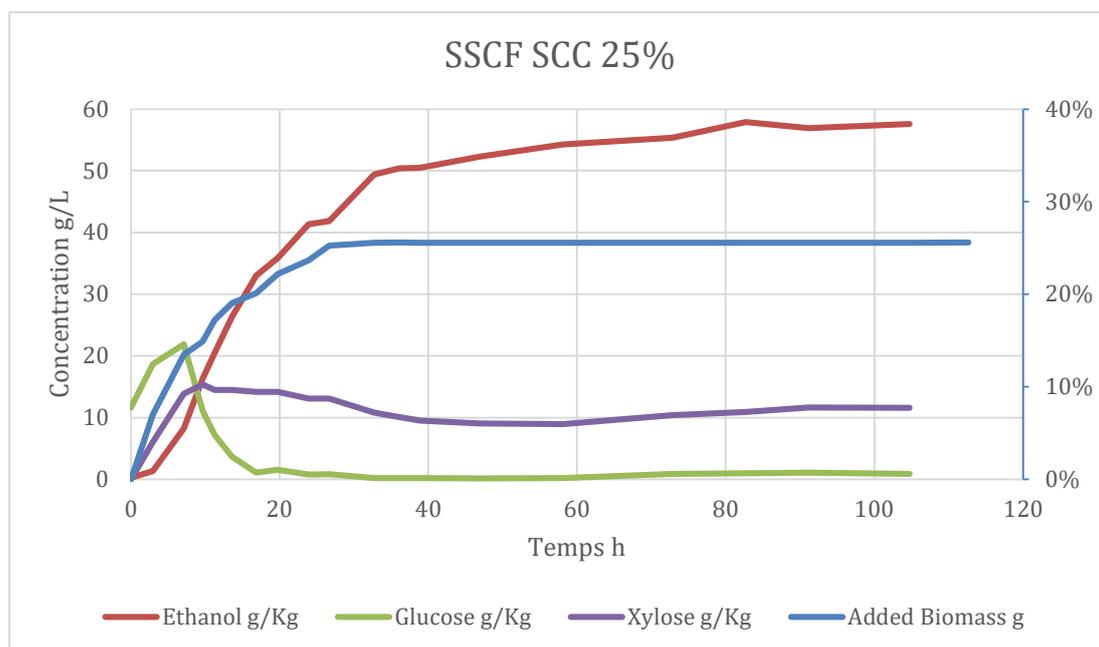


Figure 73. Concentration résiduelle de glucose, de xylose et d'éthanol au cours d'une expérience en Fed batch. La courbe bleue représente le taux de matières sèches cumulé au cours du temps

La production d'éthanol se montre efficace, et une concentration finale de 57,5g/L est obtenue en fin de fermentation.

Nous avons dans cette expérience réussie à maintenir un résiduel de glucose nul, cela est probablement dû à la diminution du taux de matières sèches dans le mout.

Pour le xylose nous observons une concentration résiduelle assez constante à partir de 10h, il semble donc que la levure soit capable de consommer le xylose au fur et à mesure qu'il est produit mais n'est pas capable d'en assimiler la totalité. Le résiduel en fin de fermentation reste peu élevé (11,5g/L).

Cette expérience montre que le gain que nous avons pu observer en conduite batch avec le lavage de la biomasse ne se retranscrit que peu lors de la conduite

en Fedbatch, Les résultats nous montrent que la conduite en Fed batch permet déjà de se départir d'une partie des effet des inhibiteurs présents dans la biomasse prétraitée, le lavage n'apporte que peu d'avantages en sus.

Le rendement de production final est de 214 litres d'éthanol produit par tonne de biomasse utilisé.

Tableau 19. Résultats des expériences en Fed Batch à partir de SCC prétraité

Taux de matières sèches %	33	31	28	25 lavé
Concentration finale EtOH g/L	57	54	58,5	57,5
Xylose résiduel g/L	29,5	17,5	15,5	11,5
Xylose consommé	49%	66%	68%	77%
Glucose résiduel g/L	24	12	4,6	0,8
Glucose consommé	78%	88%	95%	98%
Rendement éthanol (%rendement max) sucres consommés	86%	75%	82%	86%
Rendement éthanol (%rendement max)	63%	62%	72%	79%
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	185	186	212	214

Ces expériences en Fed batch nous ont permis de démontrer la faisabilité d'une hydrolyse enzymatique et d'une fermentation concomitante à de très hautes teneurs en matières sèches finales (supérieure à 30%) avec des résultats concluants et bien meilleurs que ceux observés à des taux de matières sèches équivalents en mode batch. Cela rejoint les observations de Olofsson et al., 2010 lors de leurs expériences en Fed-batch SSCF (paille de blé prétraité à la vapeur).

Malgré ce constat, nous avons pu également démontrer qu'en terme de performance brute, concentration finale d'éthanol et rendement en litres par tonne, il était plus avantageux de diminuer le taux de matières sèches, et que cela était faisable sans diminuer la concentration finale en éthanol (58.5g/L à 28% comparé à 57g/L à 33%).

Nous avons aussi pu tester cette conduite Fed batch avec de la biomasse prétraitée et lavée en vue d'enlever certains composés solubles inhibiteurs de la fermentation. Nous avons remarqué un petit gain dans les performances du procédé mais celui-ci n'est pas aussi drastique qu'en conduite batch. Au vu de ces

résultats nous sommes confiants sur le fait que la conduite Fed batch puisse apporter une amélioration des résultats du procédé global.

5.3.2. Impact de l'hydrolyse sur la consommation du xylose et la production d'éthanol

5.3.2.1. PH-SSCF versus SSCF

Comme présenté en introduction, de nombreuses conduites de procédés ont été mises en œuvre ces dernières années. Pour le projet BABETREAL, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux conduites permettant d'effectuer toutes les étapes en un seul réacteur.

Nous avons donc décidé de comparer les performances d'une conduite en PH-SSCF à celles d'une conduite en SSCF.

Nous avons observé lors d'hydrolyses enzymatiques de substrats prétraités, que la grande majorité des chaînes de sucres sont hydrolysées après seulement 24h (libération de 90% du glucose et 85% du xylose). Nous nous sommes donc cantonnés à une comparaison entre 24h PH-SSCF, 48h PH-SSCF et SSCF.

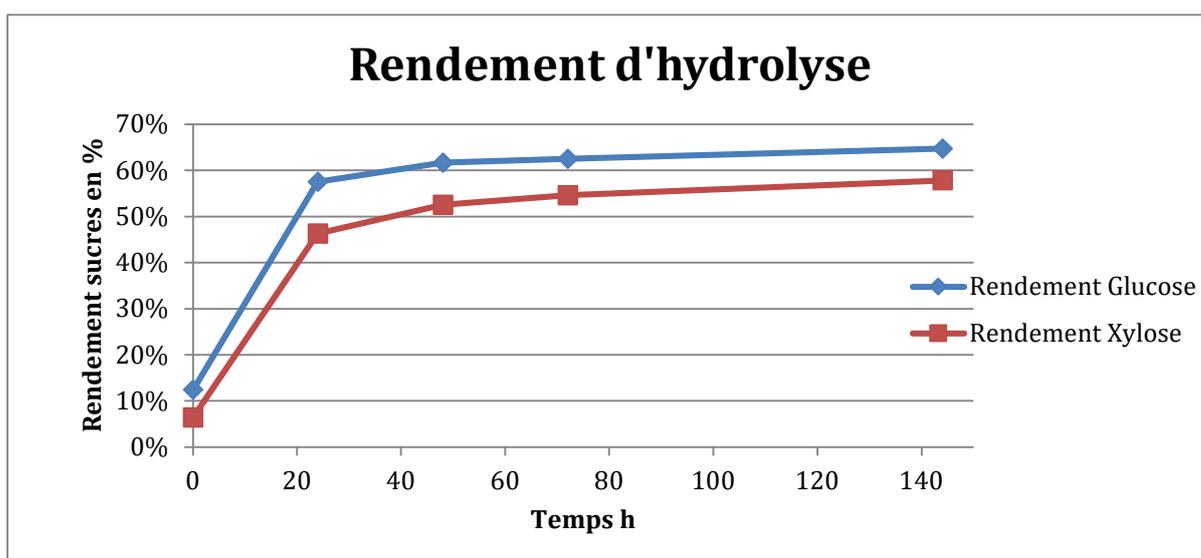


Figure 74. Evolution du rendement d'hydrolyse (%) du Glucose et du xylose au cours du temps. 50ml de moût en Erlen Meyer. Bioextrudat de SCC à 5%, température 45°C, Cellic Ctec2 15FPU/g et NS20022 10% (v/v) du volume de Ctec2.

Des expériences comparatives ont été menées entre une conduite en SSCF et une pré-hydrolyse à 50°C pendant 24h ou 48h, suivies d'une inoculation et de la fermentation à 30°C (PH-SSCF).

Les résultats montrent une concentration finale d'éthanol sensiblement similaire dans les 2 expériences, à environ 35g/L d'éthanol.

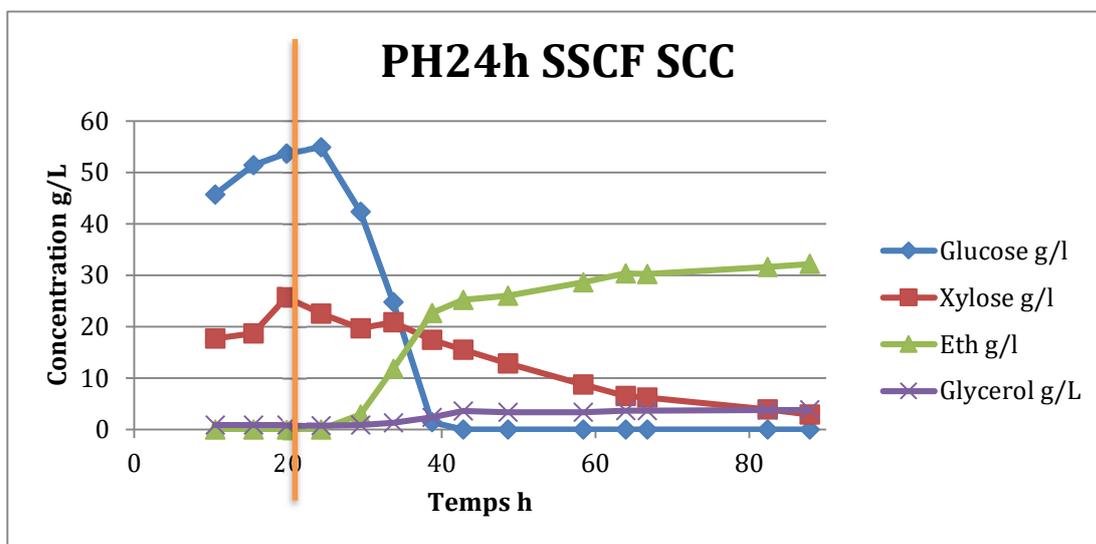


Figure 75. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences avec pré-hydrolyse de 24h suivi de SSCF à partir de SCC à 20%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation.

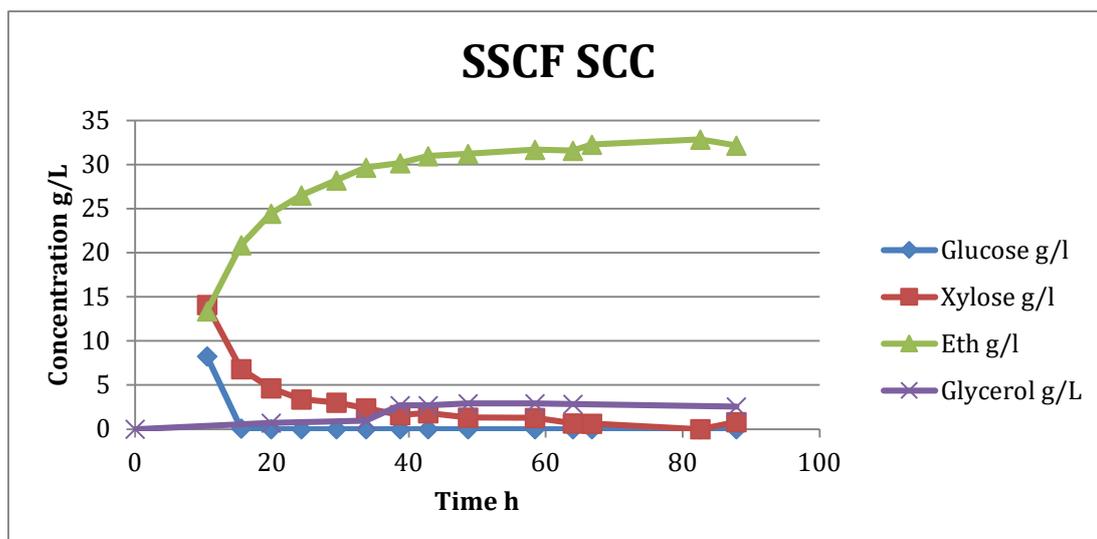


Figure 76. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences de SSCF à partir de SCC à 20%

On remarque que la cinétique de concentration résiduelle en glucose est très différente entre les 2 expériences, en PH-SSCF la concentration de glucose est très élevée en début de fermentation avec près de 60g/L. Le glucose est rapidement consommé, mais comme il a été démontré dans la littérature, cela peut entraîner un phénomène de répression catabolique, en effet, ces hautes concentrations en glucose peuvent entraîner une inhibition de la consommation du xylose.

Cela se traduit d'ailleurs par une consommation du xylose retardée comparativement à une conduite en SSCF. En conduite PH-SSCF, les levures mettent plus de temps à consommer le xylose et une faible concentration résiduelle peut être observée en fin de fermentation.

Tableau 20. Résultats comparatif du procédé en SSCF ou en PH-SSCF (pré-hydrolyse de 24h)

SCC	SSCF	PH24-SSCF
Taux de matière sèche % m/m	20	20
Concentration finale EtOH g/L	33	33
Xylose résiduel g/L	0	3

Rendement éthanol (%rendement max) sucres consommés	78%	80%
Rendement éthanol (%rendement max)	77%	77%
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	167	166

Ces expériences ont été répétées à partir d'un autre lot de SCC à des concentrations plus élevées en matières sèches (22-25%) et donnent des résultats différents, notamment une production globale d'éthanol plus élevée, et une concentration résiduelle de xylose beaucoup plus élevée. Des disparités dans les pourcentages de glucose, xylose et lignine ont été observées entre l'ancien lot et ce nouveau lot, ce qui pourrait expliquer ces différences de résultats. Les deux lots ont aussi été traités différemment lors de leur phase de pré conditionnement, ce qui peut modifier le comportement de la matière durant le prétraitement.

Tableau 21. Comparatif des deux lots de SCC utilisés, pourcentage de cellulose (m/m) et d'Hémicellulose et leurs rendements d'hydrolyse respectifs.

Sweet Corn Cob	Lot 2016	Lot 2017
Matière minérale (% MS)	6%	5%
Fibre insoluble (% MS)	78%	74%
Cellulose (% MS)	38%	30%
Hémicellulose (% MS)	33%	38%
Lignine (% MS)	7%	6%
Rendement d'hydrolyse		
Glucose (%)	62%	60%
Rendement d'hydrolyse Xylose (%)	32%	38%



Figure 77. Comparaisons de l'aspect visuel des différents lots de maïs doux utilisé. Lot 2016 à Gauche, Lot 2017 à Droite.

Malgré ces différences, les conclusions sont similaires à celles énoncées précédemment, la conduite en PH-SSCF ne semble pas permettre d'améliorer la production d'éthanol par rapport à une conduite en SSCF. La haute quantité résiduelle de xylose en fin de fermentation semble être due à la différence de lot.

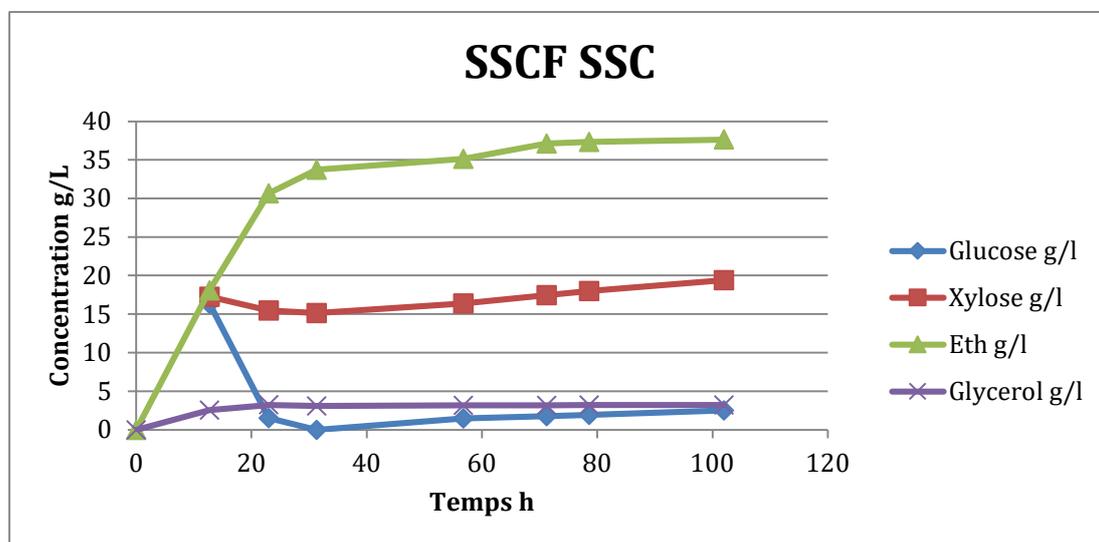


Figure 78. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences de SSCF à partir de SCC à 22%

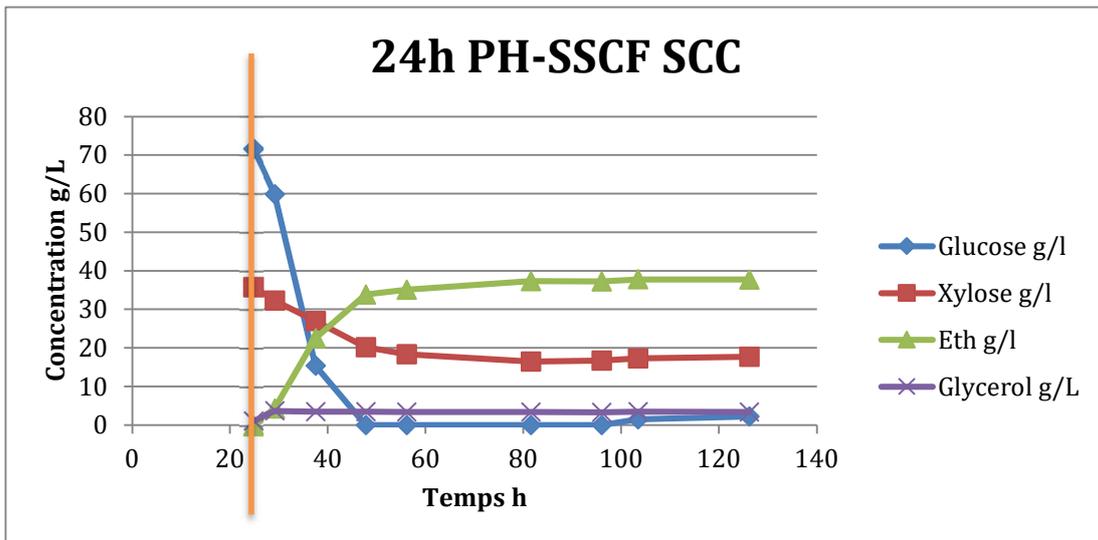


Figure 79. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences en Pré-hydrolyse de 24h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de SCC à 22%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation

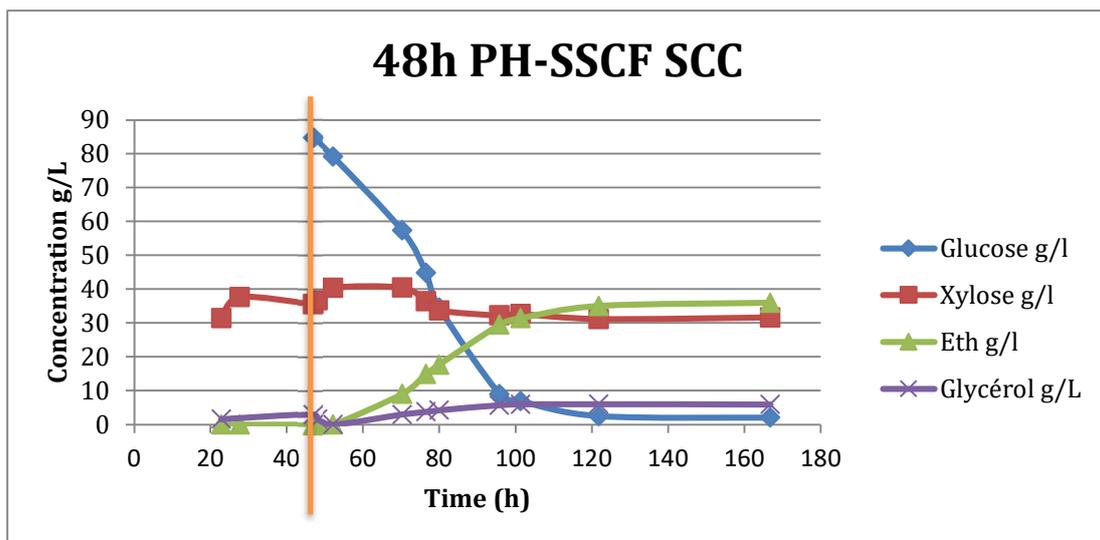


Figure 80. Concentrations du glucose, xylose et éthanol lors d'expériences de pré-hydrolyse de 48h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de SCC à 25%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation.

Tableau 22. Résultats comparatif du procédé en SSF ou en PH-SSF (préhydrolyse de 24h ou de 48h)

SCC	SSF	PH24-SSF	PH48-SSF
Taux de matière sèche % m/m	22	22	25
Concentration finale EtOH g/L	38	38	36
Xylose résiduel g/L	19	18	32
Rendement éthanol (%rendement max) sucres consommés	97%	89%	84%
Rendement éthanol (%rendement max)	77%	73%	60%
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	187	177	145

Ces résultats sont une confirmation que la conduite en SSF est aussi efficace qu'une conduite avec pré-hydrolyse de 24h et même plus performant qu'une conduite avec pré-hydrolyse de 48h.

Les résultats observés pour la pré-hydrolyse de 48h peuvent s'expliquer par le fait que le taux de matières sèches est plus élevé, ainsi que par le fait que la forte concentration en sucre au début de la fermentation a pu perturber le métabolisme de *S. cerevisiae* CelluX 4.

Des tests similaires effectués à partir de paille d'orge (BS) ont aussi produit des résultats analogues.

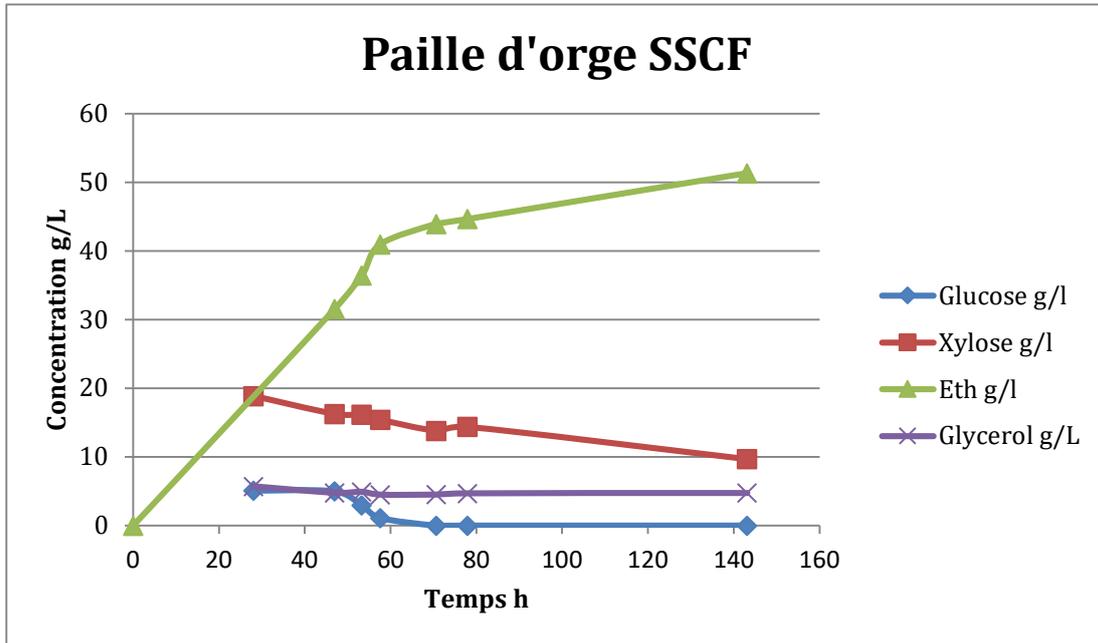


Figure 81. Concentrations du glucose, xylose, éthanol et glycérol lors d'expériences de SSCF à partir de BS à 25%

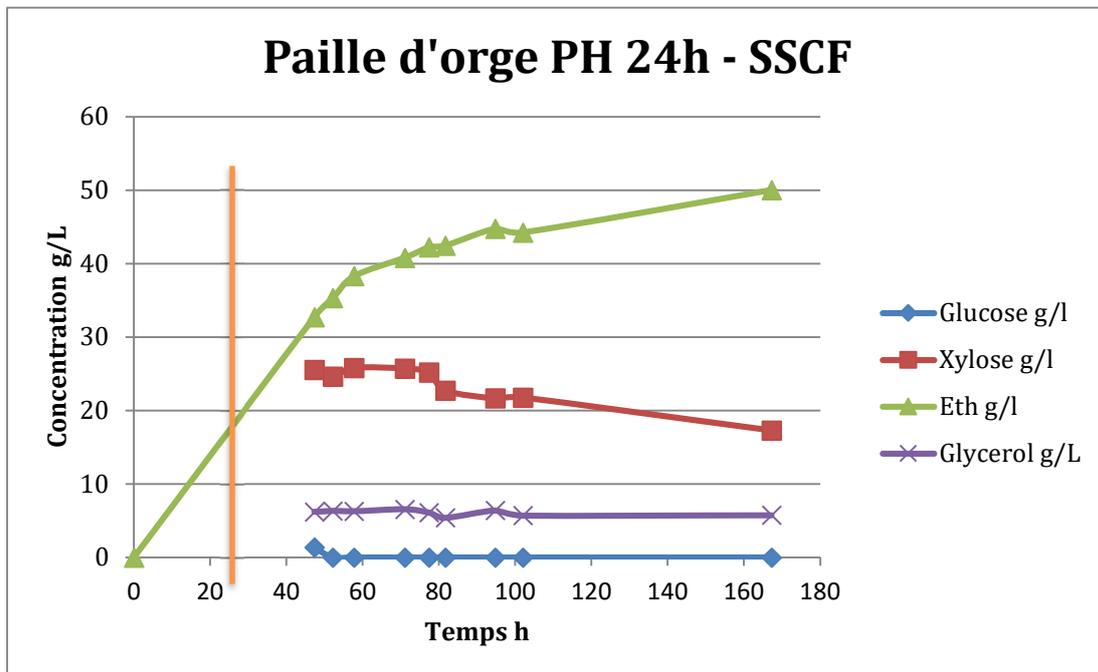


Figure 82. Concentrations du glucose, xylose, éthanol et glycérol lors d'expériences de pré-hydrolyse de 24h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de BS à 25%. Le trait orange représente la fin de la pré-hydrolyse et le début de la fermentation

Cette partie de notre travail nous a permis de démontrer que la meilleure conduite, dans notre configuration actuelle et avec 2 de nos substrats modèle, est une conduite d'hydrolyse enzymatique et de fermentation concomitante en SSCF. Cette conduite, en permettant de conserver les concentrations de sucres libres faibles, permet d'améliorer la consommation du xylose tout en réduisant le temps total du procédé, le nombre de réacteurs nécessaires mais aussi en faisant grandement diminuer les risques de contamination bactérienne du moût hydrolysé nous a permis d'atteindre des performances remarquables, avec une concentration finale d'éthanol aux alentours de 40g/L avec du résidu de maïs doux et plus de 50g/L avec de la paille d'orge.

Cela rejoint les résultats obtenus dans la littérature par Z.-H. Liu et al., 2014 et, qui démontrent un avantage certain de la conduite en SSF (ou SSCF dans notre cas) par rapport à une conduite en SHF (Olofsson, Bertilsson, et al., 2008).

Ces expériences permettent aussi de démontrer que l'utilisation de l'extrusion bi-vis permet d'effectuer un prétraitement robuste et adaptable permettant de bonnes performances malgré de grande variabilité de matières premières inhérente à la ressource agricole.

5.3.2.2. Pré-Hydrolyse sélective

Une autre stratégie que nous avons testée a été d'induire une hydrolyse pré-sélective des hémicelluloses avant l'hydrolyse de la cellulose.

L'objectif étant de libérer une majorité de xylose pour forcer sa consommation par les levures avant la présence de glucose libéré par l'action des enzymes de type cellulase.

Nous nous sommes rapidement heurtés à un problème de liquéfaction du milieu, qui sans présence de cellulase reste très compact et induit de ce fait de réel problème d'échange thermique et de mélange.

Une modification a été envisagée en additionnant les hémicelluloses avec 1FPU/g de cocktail Ctec2, permettant d'initier une liquéfaction de la biomasse tout en essayant de limiter la libération enzymatique de glucose.

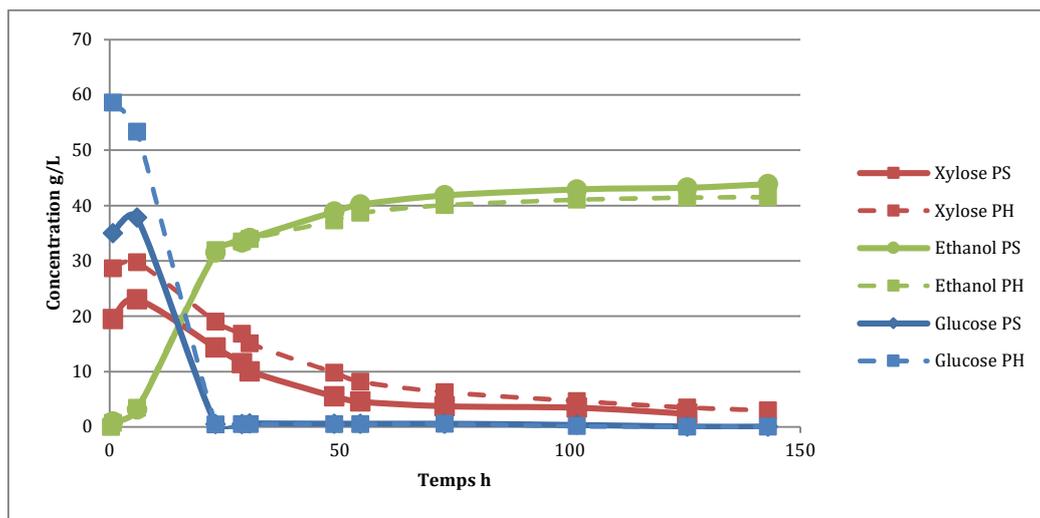


Figure 83. Concentrations du glucose, xylose, éthanol et glycérol lors d'expériences de pré-hydrolyse sélective de 24h suivi de la fermentation (SSCF) à partir de SCC à 25%.

Au vues des concentrations de glucose élevée au début de la fermentation en Pré-Hydrolyse sélective (40g/l), il semblerait que le cocktail Ctec2, même à une faible concentration de 1FPU/g de biomasse ait déjà commencé à hydrolyser une bonne partie de la cellulose, biaisant de ce fait nos objectifs expérimentaux.

Malgré cela, nous avons pu observer une légère amélioration des performances en Pré-Hydrolyse sélective.

Les résultats obtenus précédemment ainsi que les données de la littérature laissent à penser que cette stratégie d'initier la consommation du xylose avant le glucose pourrait permettre d'améliorer les performances du procédé.

Nos essais n'ont pas été concluants à cause de l'utilisation de Cellic Ctec2, mais l'utilisation d'autres cocktails enzymatiques plus spécifiques pourrait permettre de valider cette hypothèse et de potentiellement améliorer significativement la consommation du xylose par une limitation de l'impact de la répression catabolique du glucose sur le xylose.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse, ont permis de mettre en évidence la présence de sels à des concentrations élevées, provenant du prétraitement par extrusion bi-vis lors du procédé de production d'éthanol de seconde génération BABETREAL5.

Nous avons pu démontrer que l'ajout d'une phase de filtration dans la filière d'extrusion pouvait permettre de grandement améliorer la consommation du xylose et les performances globales du procédé en éliminant une grande partie de ces sels, démontrant donc un fort impact de ceux-ci sur la consommation du xylose par une levure *Saccharomyces Cerevisiae* génétiquement modifiée pour consommer les pentoses.

Malgré l'ajout de cette phase de filtration, nous avons pu mesurer dans les extrudats des concentrations de sels, principalement sodium et sulfate, aux alentours de 0.2 Molaire : concentrations encore élevées au regard de la littérature.

Des tests à différentes concentrations en matières sèches nous ont permis de démontrer que les meilleurs résultats étaient obtenus en utilisant 20% à 25% de biomasse sèche avec des concentrations en éthanol finale aux alentours de 40g/L. L'élimination, par un lavage de la biomasse prétraitée, d'une partie des sels résiduels malgré l'étape de filtration nous a permis de considérablement augmenter les performances avec des concentrations en éthanol de près de 70g/L (25% de matières sèches) tout en démontrant un effet du taux de matières sèches complémentaire à l'effet des sels de prétraitement sur la consommation du xylose.

En comparaison les meilleures performances actuelles (avec un dispositif de prétraitement similaire) ont été obtenues par Han et al., 2016 avec des concentrations finale en éthanol de 60g/L en utilisant du *Miscanthus* prétraité par extrusion bi vis (NaOH) puis lavé. (23% de matière sèche dans le mout, 30FPU/g de Cellic Ctec2, SSF sans consommation du xylose).

Par la suite, des expériences en flacons scellés puis en chemostat ont permis de clairement démontrer le rôle inhibiteur des sels sur la fermentation, et plus spécifiquement sur la consommation du xylose par notre levure modèle Cellux 4. Selon nos premiers résultats, il semblerait que le potentiel inhibiteur de certains sels soit plus important que d'autres.

Nos travaux en chemostat nous ont par ailleurs permis de confirmer la présence d'un effet diauxique du glucose sur la consommation du xylose, indépendamment de la présence ou de l'absence de sels.

Ces résultats préliminaires méritent d'être approfondis pour pouvoir comprendre en détail l'impact de ces sels au niveau du métabolisme fermentaire de la levure.

Pour pouvoir résoudre ces problématiques d'inhibition de la consommation du xylose, il est nécessaire de bien identifier les modes d'actions de chacun des inhibiteurs ainsi que leurs contributions spécifiques à l'inhibition de la voie de consommation du xylose.

Pour cela, il semble important de répondre à plusieurs questions :

Existe-t-il une limitation au niveau des transporteurs membranaires du xylose ?

Où pourrait-il y avoir une inhibition d'une ou plusieurs enzymes de la voie d'assimilation du xylose (XI, XR/XDH ou cofacteurs), ou de la voie des pentoses phosphates ?

Rencontre-on des problématiques similaires avec des souches utilisant une autre stratégie de consommation du xylose (XR/XDH) ?

En absence de répression catabolique, avec xylose en substrat unique, observe-t-on les mêmes inhibitions ?

Une analyse de la littérature nous a permis de découvrir que Casey et al (2013) ont observé les mêmes effets d'inhibition par les sels en utilisant une levure consommant les pentoses mais dont la voie métabolique diffère de celle de Cellux 4. Nous avons pu reproduire leurs résultats en utilisant une levure OGM dont les modifications sont similaires à celle utilisée par Casey et al. En effet, des partenaires du projet nous ont fourni une souche de *Saccharomyces cerevisiae* modifiée génétiquement pour exprimer la Xylose Reductase/Xylitol Dehydrogenase (Sur une base de souche Ethanol RED, Lesaffre). Nous l'avons testé dans les mêmes conditions que la souche CelluX 4 avec notre substrat de référence (SSC) et nous avons observé des effets inhibiteurs encore plus marqués sur la consommation de xylose.

Cela pourrait nous aiguiller sur un problème ne se situant pas au niveau des enzymes de réduction du xylose (XI, XR/XDH ou cofacteurs), mais plutôt en amont au niveau des transporteurs membranaires ou en aval au niveau de la xylulokinase ou de la voie des pentoses phosphates.

Des techniques de biologie synthétique pourraient permettre, en exprimant des transporteurs membranaires spécifiques au xylose, de nous aiguiller sur le rôle de ces transporteurs dans cette inhibition par les sels. Différentes stratégies ont été développées ces dernières années en vue d'améliorer la consommation du xylose, expression de transporteurs spécifiques, ou modification de transporteur endogène (Sharma et al., 2018). Une étude comparative de ces différentes stratégies en présence de sels pourrait permettre de faire la lumière sur un potentiel rôle des transporteurs.

Enfin, des tests *ex-vivo* de l'enzyme xylose isomérase ainsi que de la xylose réductase et la xylitol déshydrogénase en présence ou non de sels, pourraient permettre de révéler un impact potentiel des sels sur le fonctionnement de ces enzymes.

Au vue de la surproduction de glycérol par la levure lors de la présence de sels, des expériences de biologie moléculaire (transcriptomique) pourraient nous permettre d'étudier les régulations d'expressions génomiques induites par la présence de ces sels dans le milieu de culture, et ainsi comprendre plus en détail les mécanismes entraînant une diminution de la consommation du xylose.

Une voie d'amélioration pourrait être trouvée en améliorant la détoxification du substrat avant fermentation, des processus existent pour les autres inhibiteurs tels que les phénols (Moreno, Ibarra, et al., 2013) ou les HMF/Furfural. D'après nos recherches, le lavage de la biomasse semble être efficace, et son incorporation au procédé pourrait être une option viable (Han et al., 2016).

Enfin, une optimisation du prétraitement, notamment des quantités d'acide et de base utilisés ou de l'efficacité de la filtration pourrait permettre de réduire les sels résiduels sans modifier drastiquement le procédé et donc d'atteindre de meilleures performances en termes de production d'éthanol.

Une autre voie d'amélioration pourrait être la sélection de souches plus adaptées à la présence de sels dans le milieu, la production de ces souches pouvant se faire à travers des expériences de sélection positive en présence de sels dans le milieu de culture à l'instar des travaux de Tomás-Pejó et al., 2010.

Nous avons démontré un effet sur la consommation de xylose avec des forts taux de matière sèche, même en absence de sels (lavé vs non lavé). Il serait intéressant de se pencher sur les effets de la matière sèche sur le métabolisme de la levure, pour cela des expériences en milieu minimum dans lequel serait ajouter de la biomasse non hydrolysable nous permettrait de démontrer un effet sur la consommation du xylose, sur la croissance cellulaire, et peut être de déterminer un seuil limite à ne pas dépasser.

Pour observer ces effets, il serait nécessaire de pouvoir suivre l'évolution de la biomasse microbienne au cours de ces fermentations en milieux « quasi solides ». En effet, dans l'état actuel des choses, il est impossible de quantifier cette biomasse par les moyens classiques (DO, pesée, cytométrie de flux). C'est pourquoi nous avons développé une technique de quantification de *Saccharomyces cerevisiae* par PCR quantitative lors de fermentation sur matrice lignocellulosique.

Ces travaux font l'objet d'une publication scientifique en cours de soumission présentée dans la partie annexe.

En vue de limiter les effets délétères des hauts taux en matières sèches, nous avons pu démontrer l'efficacité d'une conduite en Fed-batch SSCF. Cette conduite permet d'effectuer la fermentation à des taux de matières sèches supérieurs à 30% ce qui ne serait pas possible en batch. De plus, nous avons réussi à produire près de 60g/L d'éthanol, un des meilleurs résultats de la littérature en utilisant de la biomasse lignocellulosique.

Des expériences devront venir compléter nos résultats en vue d'optimiser la concentration maximale en matière sèche ainsi que la cinétique d'apport de cette biomasse.

Nous sommes confiants sur le fait que cette conduite en Fed-batch permettra d'améliorer encore plus les performances du procédé lors du développement industriel de cette technologie.

Pour finir, les travaux sur milieu synthétique en chemostat nécessitent des approfondissements. Il serait intéressant de tester d'autres sels et à différentes concentrations en vue de pouvoir définir un seuil limite à partir duquel les effets délétères sur la consommation de xylose apparaissent.

Cela nous permettrait aussi de tester la présence de cette inhibition lors de l'utilisation de xylose en substrat unique, sans répression catabolique ni compétition pour les transporteurs membranaires.

Finalement, il nous semblerait intéressant d'approfondir les connaissances sur l'effet de la cinétique de libération des sucres sur leurs consommations.

En premier lieu, nous avons pu démontrer que la meilleure conduite de procédé était une conduite en simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF) qui, en limitant la quantité de sucres libres, permet d'atteindre des performances supérieures à des conduites de pré-hydrolyse (24h ou 48h) tout en permettant de réduire les temps de fermentation et le nombre de réacteurs utilisés. Cela rejoint les résultats obtenus par de nombreux travaux dans la littérature. (Olofsson, Bertilsson, et al., 2008)(Z.-H. Liu et al., 2014)...

Nous avons aussi essayé d'effectuer des essais de pré-hydrolyse sélective, en vue de libérer préférentiellement le xylose pour forcer sa consommation. Ces essais n'ont pas été concluants à cause d'une mauvaise liquéfaction du milieu, mais l'utilisation de nouveaux cocktails hemicellulotiques pourrait permettre de régler ce problème et de potentiellement améliorer considérablement la consommation du xylose.

En conclusion, ces travaux de thèse ont donc permis d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'inhibition de la consommation du xylose par une levure OGM, notamment le rôle que peuvent jouer différents sels provenant du prétraitement dans cette inhibition. Des études futures pourront permettre de faire tout la lumière sur ces mécanismes, permettant ainsi une amélioration significative des rendements de production de bioéthanol de seconde génération en vue de leur mise sur le marché.

7.AMELIORATION SPECIFIQUE DU PROCEDE BABET REAL5

7.1. COUPLAGE EXTRUSION

En vue de tester la viabilité du procédé complet, un système de couplage extrusion/bioréacteur a été développé au LCA (INP Toulouse).

Pour cela, l'extrudeur servant à prétraiter la majorité de nos biomasses (Clextal EV25) a été connecté à un bioréacteur instrumenté Solaris de 22L.

Le dimensionnement du bioréacteur ne nous permet pas de travailler en Fed-batch, en effet même en réglant l'extrudeur bi-vis à la vitesse minimum, le bioréacteur se remplit en seulement 4 heures, ce qui équivaut plutôt à une conduite de type préhydrolyse (PH-SSCF) avec un temps de préhydrolyse réduit, de 4 heures au maximum.

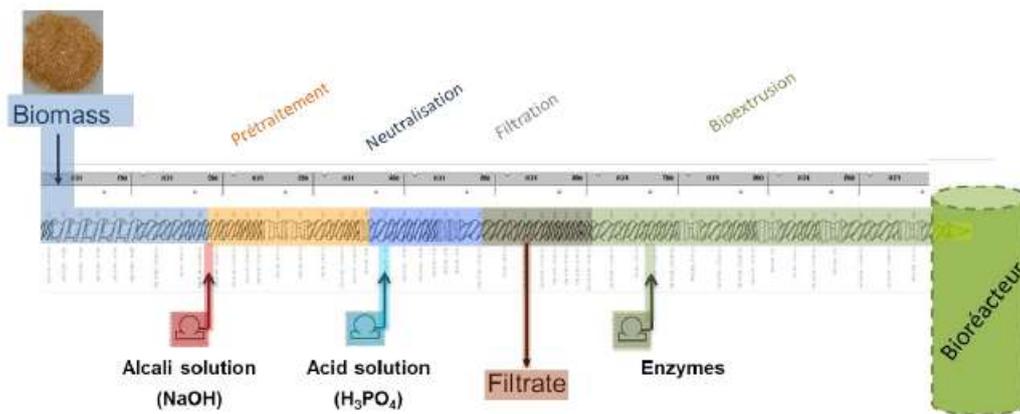


Figure 84. Schéma récapitulatif du couplage extrusion/fermentation



Figure 85. Photographie du dispositif en place au LCA

Nous avons mené 4 campagnes de couplage extrusion/fermentation au LCA. La première expérience effectuée a été menée à des très hautes teneurs en matière sèche, 27.5%. La fermentation s'est bien déroulée avec une consommation rapide du glucose et une concentration en éthanol aux alentours de 40 g/L en fin de fermentation. Le xylose a été peu consommé et on observe une concentration résiduelle de plus de 20g/L de xylose en fin de fermentation, ce qui correspond à une consommation uniquement d'environ 58% du xylose produit. (Fig. 62).

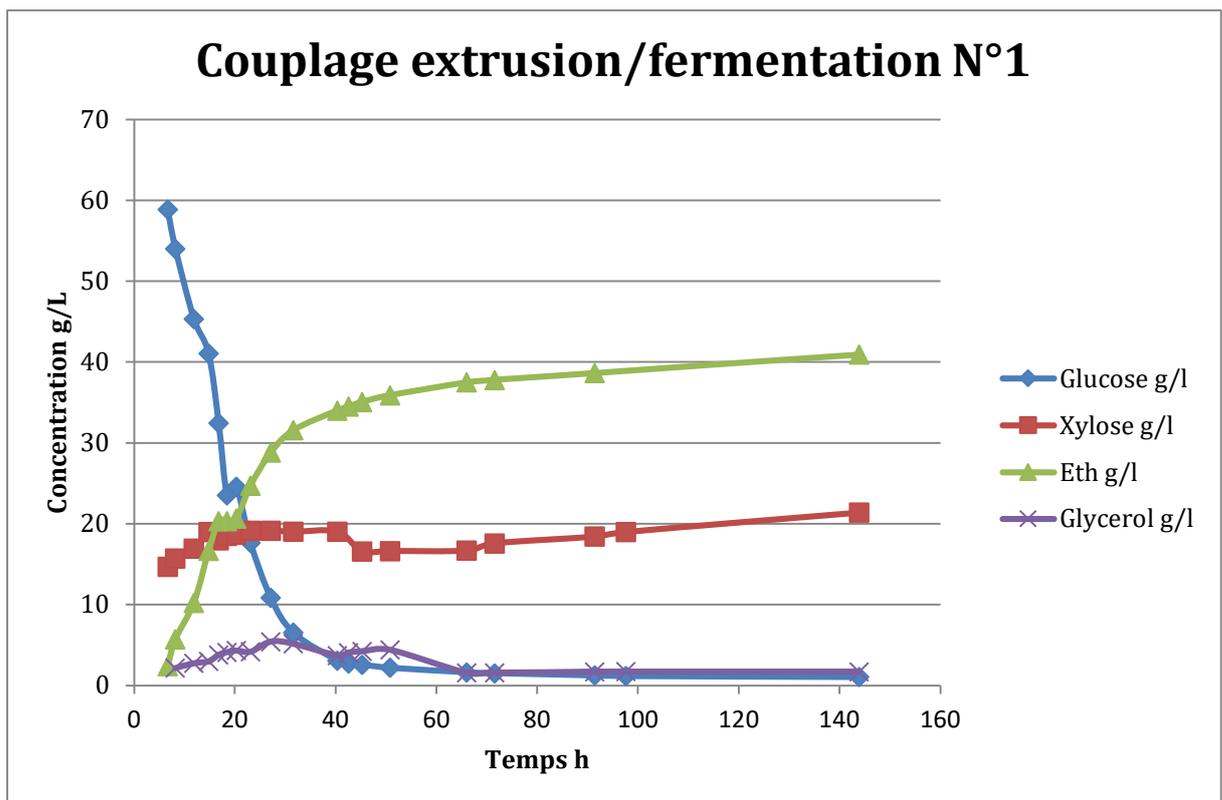


Figure 86. Concentrations de glucose, xylose, éthanol et glycérol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 27.2% en conduite SSCF.

Pour la deuxième expérience, nous avons visé un taux de matière sèche plus faible de 25% seulement. Cette expérience ne s'est pas déroulée comme prévu, avec une faible vitesse de consommation du glucose et une production d'éthanol ralentie. Nous pensons que les levures ne se sont pas développées de manière efficace, et ce pour une raison inconnue. Le xylose n'a été que peu consommé, et l'on observe une concentration résiduelle d'environ 17g/L en fin de fermentation, ce qui correspond à une consommation d'environ 65% du xylose produit.

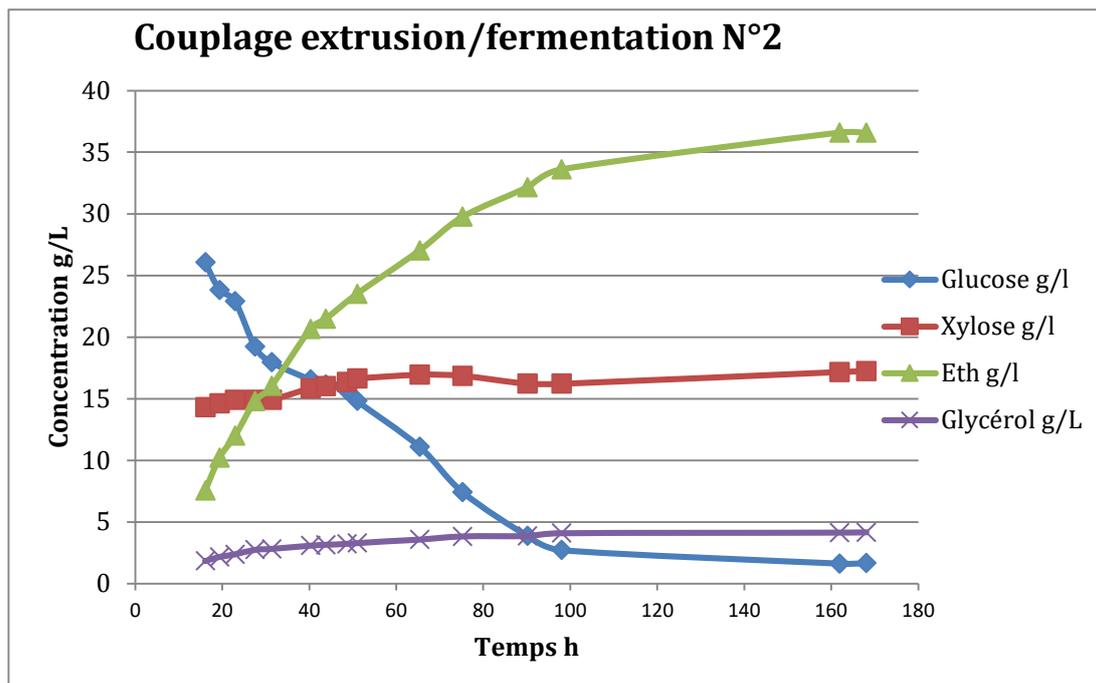


Figure 87. Concentrations de glucose, xylose, éthanol et glycérol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 25% en conduite SSCF lors d'un coulage extrudeur, bioréacteur.

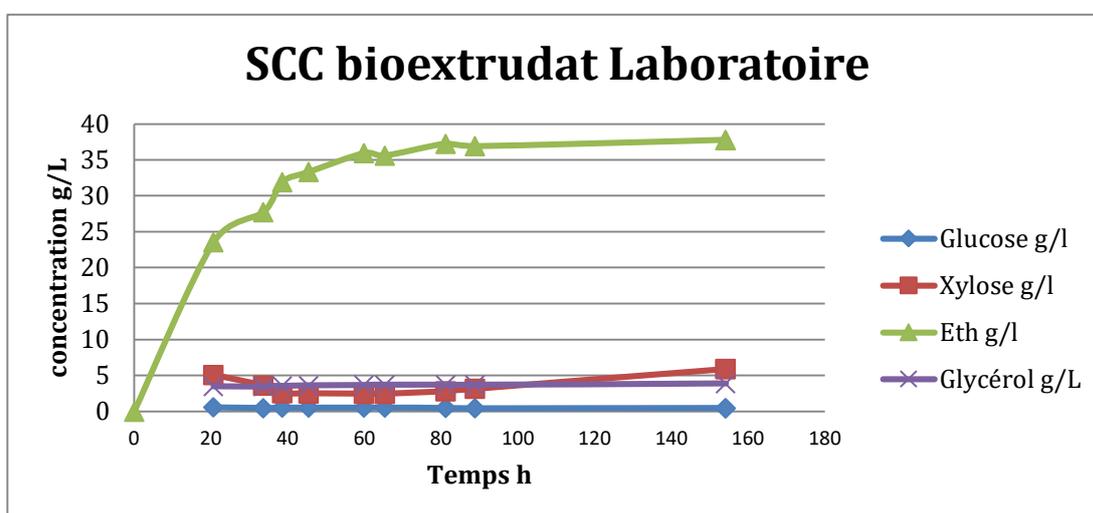


Figure 88. Concentrations de glucose, xylose, éthanol et glycérol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 25% en conduite SSCF. Substrat similaire à l'expérience précédente mais fermentation en bioréacteur de 5L dans nos locaux.

Nous avons utilisé le même extrudât pour faire une expérience comparative en laboratoire. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessus.

On observe que la concentration finale en éthanol est similaire entre les expériences de couplage et celles en laboratoire, cependant, nous observons une consommation presque totale du xylose lors des expériences en laboratoire.

Pour notre troisième expérience de couplage, à la suite des résultats préliminaires obtenus en laboratoire, nous avons visé un taux de matières sèches plus faible que précédemment, à 19%.

Le glucose a été consommé rapidement par les levures et la production d'éthanol a atteint 32g/L en fin de fermentation. Malheureusement, comme observé dans les expériences précédentes, le xylose n'a pas été entièrement consommé et on constate une concentration résiduelle finale aux alentours de 10g/L, ce qui correspond à une consommation d'environ 73% du xylose produit.

En diminuant le taux de matières sèches, nous nous attendions à observer une meilleure consommation du xylose avec un taux résiduel très bas, ce qui n'est pas le cas ici. Une investigation plus poussée nous a permis par la suite de comprendre l'origine de ce problème et de le résoudre.

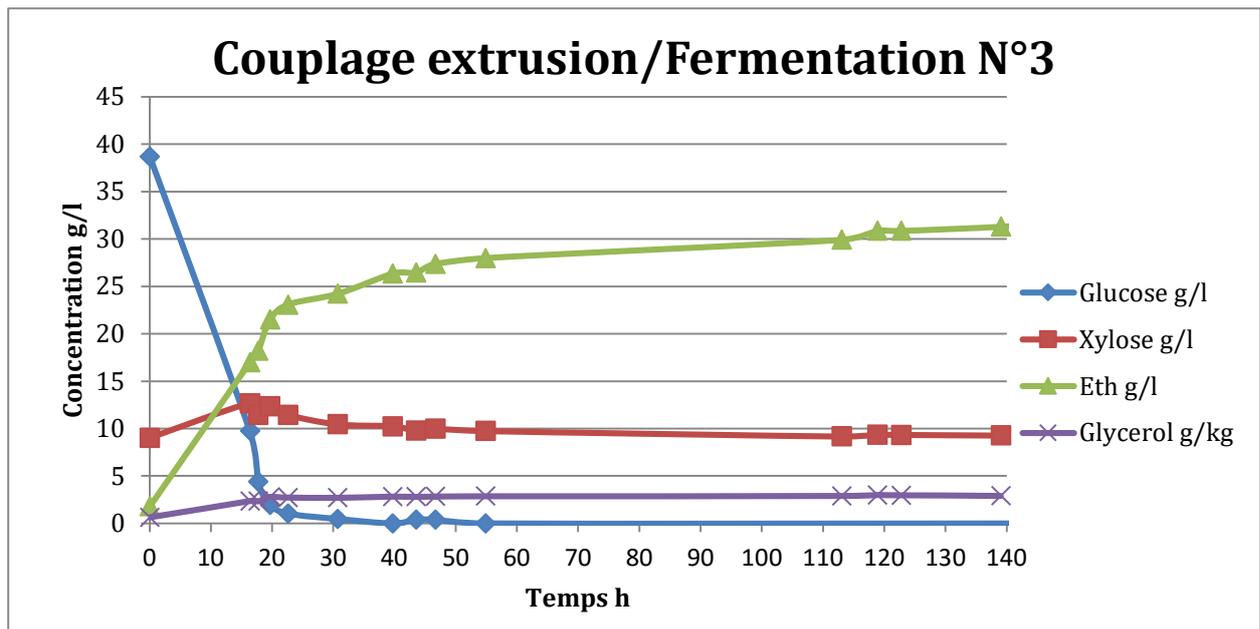


Figure 89. Concentrations de glucose, xylose et éthanol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC a 19% en conduite SSCF.

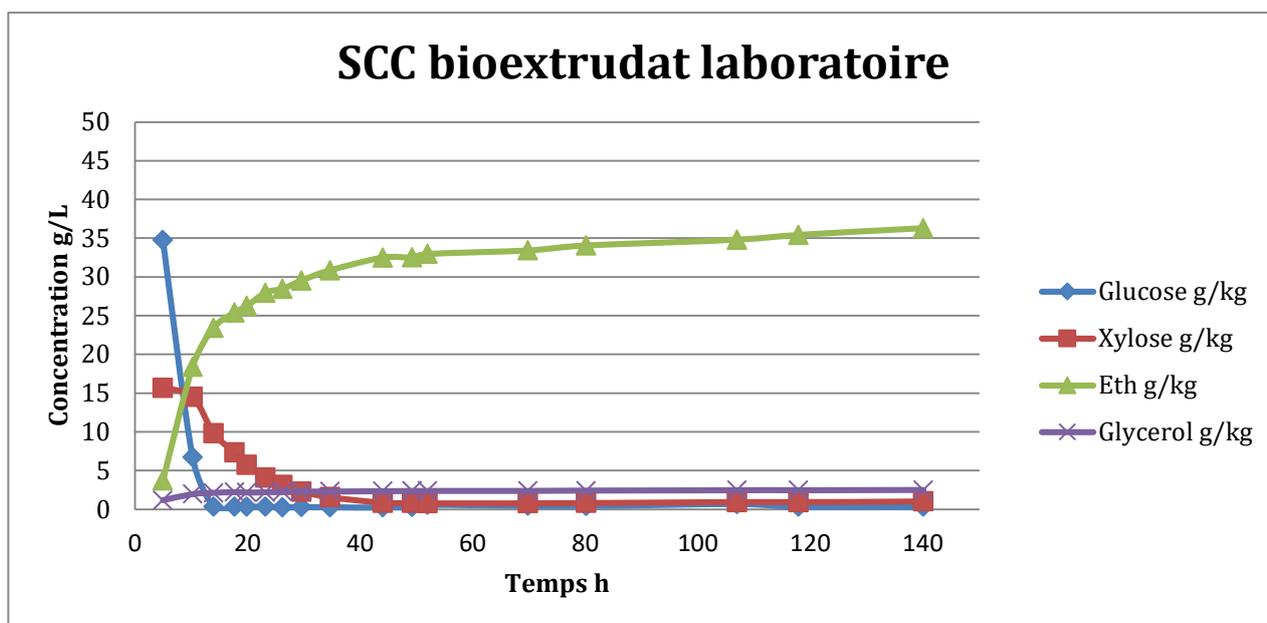


Figure 90. Concentrations de glucose, xylose et éthanol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 20% en conduite SSCF. Substrat similaire à l'expérience précédente mais fermentation en bioréacteur de 5L dans nos locaux.

Comme précédemment, nous avons récupéré du bioextrudat en vue de mener en parallèle une expérience en bioréacteur de 5L.

Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessus. Cette fois encore, le xylose a été entièrement consommé en laboratoire mais pas lors du couplage. La concentration finale d'éthanol est ici plus élevée en laboratoire que lors du couplage.

Tableau 23. Résultats comparatif des expériences de couplage et de fermentation en laboratoire des mêmes bioextrudat.

	N°2	Bioextrudat		Bioextrudat
		N°2	N°3	N°3
Expériences de couplage		laboratoire		Laboratoire
Taux de matières sèches % m/m	25	25	19	19
Concentration finale EtOH g/L	36,5	38	31,2	38
Xylose résiduel g/L	17	6	9	1
Xylose consommé (%)	65%	84%	73%	95%
Glycérol résiduel g/L	4,2	4	3	2
Rendement éthanol (%rendement max) sucres consommés	80%	96%	87%	91%
Rendement éthanol (%rendement max)	66%	88%	78%	90%
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	140	143	160	186

Force est de constater qu'il existe une amélioration significative de la consommation du xylose lors des expériences en laboratoire, pourtant le bioextrudat utilisé est le même.

Lors des expériences de couplages, le protocole mis en place découle directement de celui utilisé pour les expériences d'hydrolyse.

Lors de celles-ci, une gestion directe du pH du moût est complexe à mettre en place, c'est pourquoi il a été convenu de diluer le bioextrudat avec du Tampon citrate phosphate pH 5.

Lors de nos expériences en laboratoire, nous maintenons une régulation pH par l'ajout d'hydroxyde de potassium, directement injecté dans le bioréacteur sous l'action d'un régulateur PID. Nous diluons donc le bioextrudat avec de l'eau déminéralisée stérile en vue d'atteindre les pourcentages de matières sèches visés.

Nous avons donc mené une expérience de couplage/fermentation en utilisant de l'eau distillée stérile pour diluer le bioextrudat à la valeur nominale de 20% de masse sèche (m/m)

En réduisant la présence de sel grâce à l'utilisation d'eau distillée en lieu et place du tampon citrate phosphate, nous espérons retrouver des résultats similaires à ceux obtenus en bioréacteur de 5L (Batch SSCF) où la consommation de xylose était presque totale. Voici les résultats obtenus :

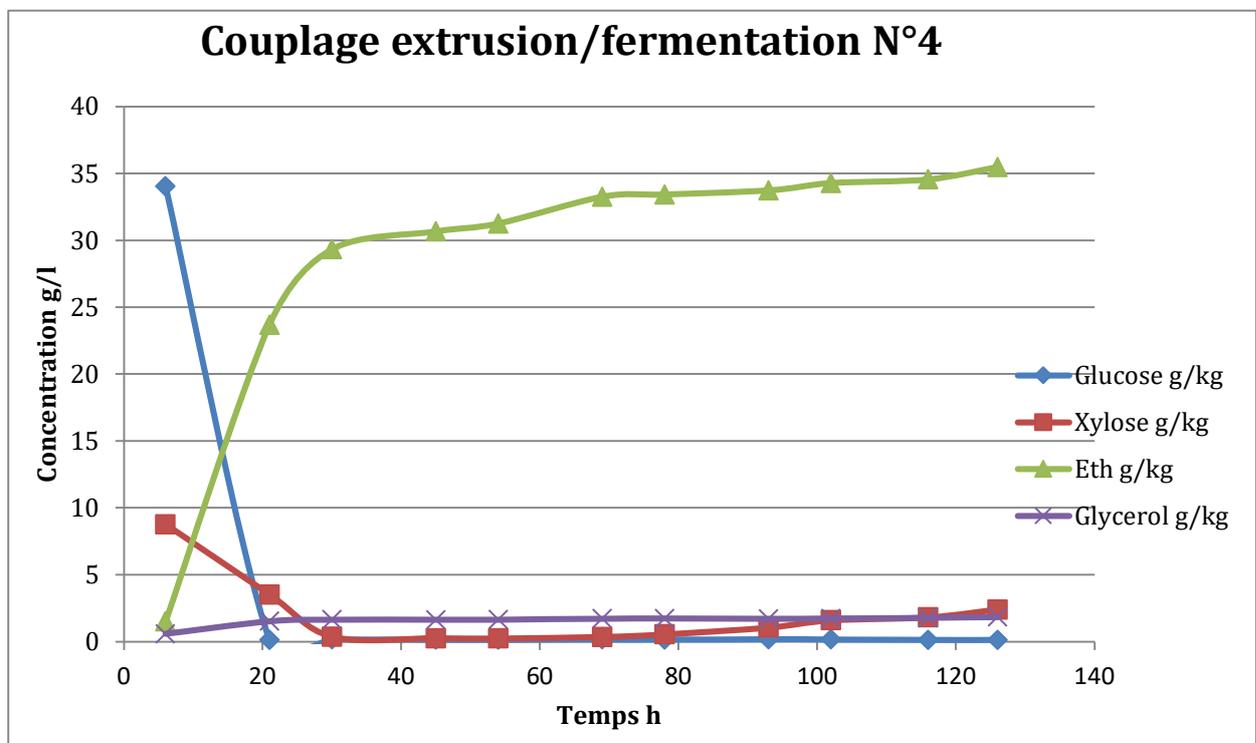


Figure 91. Concentrations de glucose, xylose et éthanol en g/L au cours du temps de fermentation de SCC à 19.5% en conduite SSCF.

Le glucose a encore une fois été rapidement consommé par les levures, et la concentration en éthanol finit au-dessus de 35g/L. Comme espéré, le xylose est presque entièrement consommé, avec un résiduel très faible de quelques g/L seulement en fin de fermentation, ce qui correspond à une consommation d'environ 93% du xylose produit.

Cela valide donc notre théorie selon laquelle l'utilisation du tampon citrate phosphate, par son apport en sels (environ 0.2Molaire), a un effet inhibiteur sur les levures. Ces expériences confirment elles aussi un rôle important des sels dans la perturbation du métabolisme fermentaire de *S. cerevisiae*, principalement sur la consommation du xylose.

Tableau 24. Résultats des différentes expériences de couplage extrusion/fermentation

Expériences de couplage	N°1	N°2	N°3	N°4
Taux de matières sèches % m/m	27,5	25	19	19,5
Concentration finale EtOH g/L	41	36,5	31,2	35,5
Xylose résiduel g/L	21,5	17	9	2
Xylose consommé en %	58%	65%	73%	93%
Glycérol résiduel g/L	ND	4,2	3	1,7
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	137	140	160	190

Cette partie de notre travail a démontré, et ce pour la première fois, la faisabilité du procédé global en couplant un extrudeur bi-vis à un bioréacteur et en effectuant le prétraitement suivi de la saccharification et de la fermentation (SSCF) tout en conservant les performances obtenues en laboratoire, nous permettant d'atteindre des concentrations en éthanol supérieure à 40g/L.

Les résultats comparatifs de différentes expériences, rejoignent ceux observés dans les manipulations en laboratoire à partir d'extrudat/bioextrudat. Nous avons réussi à améliorer significativement le rendement d'éthanol produit par tonne de biomasse utilisée tout en maximisant la consommation du xylose durant le procédé, le faisant passer d'environ 140 Litres d'éthanol par tonne de biomasse utilisée, à 190 Litres/tonne soit une augmentation de près de 40%.

7.2. Echelle pilote, mise au niveau TRL5

En vue de confirmer la faisabilité du procédé à une échelle pilote, nous avons eu accès à l'extrudeur Clextral EV53 de la plateforme technologique d'AGROMAT à Tarbes. L'objectif étant de reproduire le mieux possible le couplage extrusion/fermentation à une échelle pré-industrielle.

L'extrudeur Clextral EV53 peut prétraiter jusqu'à 150Kg de biomasse par heure, il est composé de bi-vis de 1.90m de long dont le diamètre est de 53mm.

Comme pour le Clextral EV25, les différents modules composant l'extrudeur sont réglables en température. Une partie filtration est aussi présente.

L'objectif principal de cette partie est de mettre en œuvre le procédé global à l'échelle pilote, en utilisant du SCC prétraité à haute teneur en matières sèches (>20%). Pour cela le bioréacteur sélectionné est un réacteur similaire à ceux utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour mélanger des milieux à haute viscosité. Le mélange se fait grâce à une lame hélicoïdale pouvant tourner dans les 2 sens et permettant une remontée ou une descente des matières mélangées.

Pour pouvoir alimenter le réacteur à partir de la sortie de l'extrudeur, un convoyeur a été conceptualisé, celui-ci se compose d'une vis sans fin en acier inoxydable entourée d'un fourreau réglable en température, lui aussi en acier inoxydable.

Cette installation ne sera pas nécessaire dans le cas de la construction d'une usine pilote, les bioréacteurs seront conçus pour être directement à la bonne hauteur de sortie de l'extrudeur.



Figure 92. Photographie du matériel utilisé à l'échelle pilote

Des tests d'hydrolyse ont d'abord été menés pour évaluer les différences dans les procédés de prétraitement après augmentation d'échelle.

Du fait de différences de conception dans les machines, les paramètres de prétraitements diffèrent quelque peu selon les échelles. Notamment le dispositif de filtration à l'échelle pilote ne permet pas une filtration aussi efficace qu'à l'échelle laboratoire. De ce fait l'analyse de la biomasse prétraitée en sortie d'extrudeur a montré une différence de composition, et notamment de distribution de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des fibres insolubles. Malgré cela, nous avons pu démontrer que les performances de l'hydrolyse enzymatique étaient assez similaires à celles observées à l'échelle laboratoire (Fig. 78), les différences observées sont principalement dues au fait que la quantité de cocktail enzymatique diffère, avec 15FPU/g sur EV53 et 10FPU/g sur EV25.

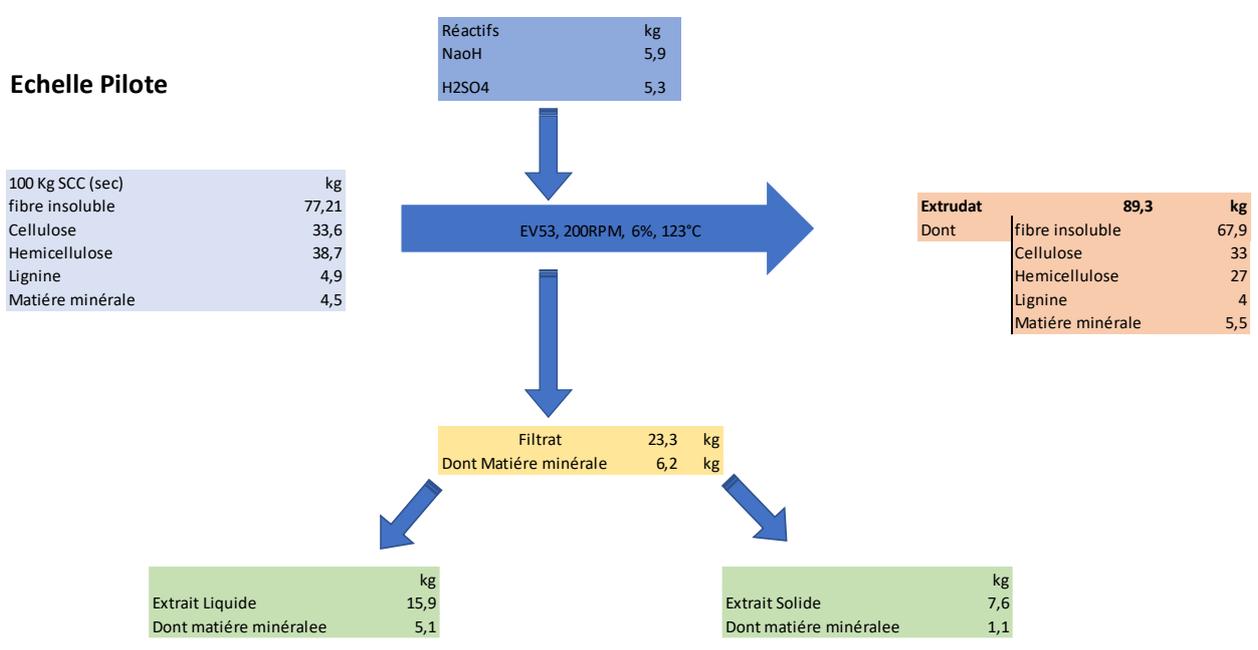
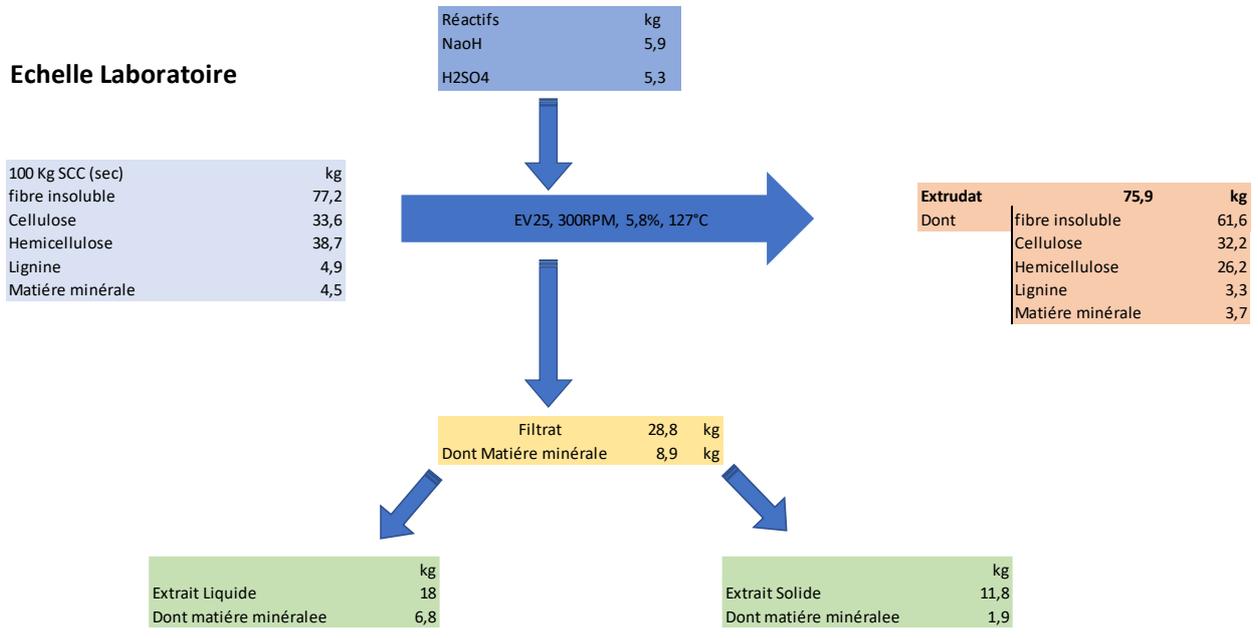


Figure 93. Comparaison des paramètres mis en œuvre à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote rapporté à 100 Kg de biomasse traitée

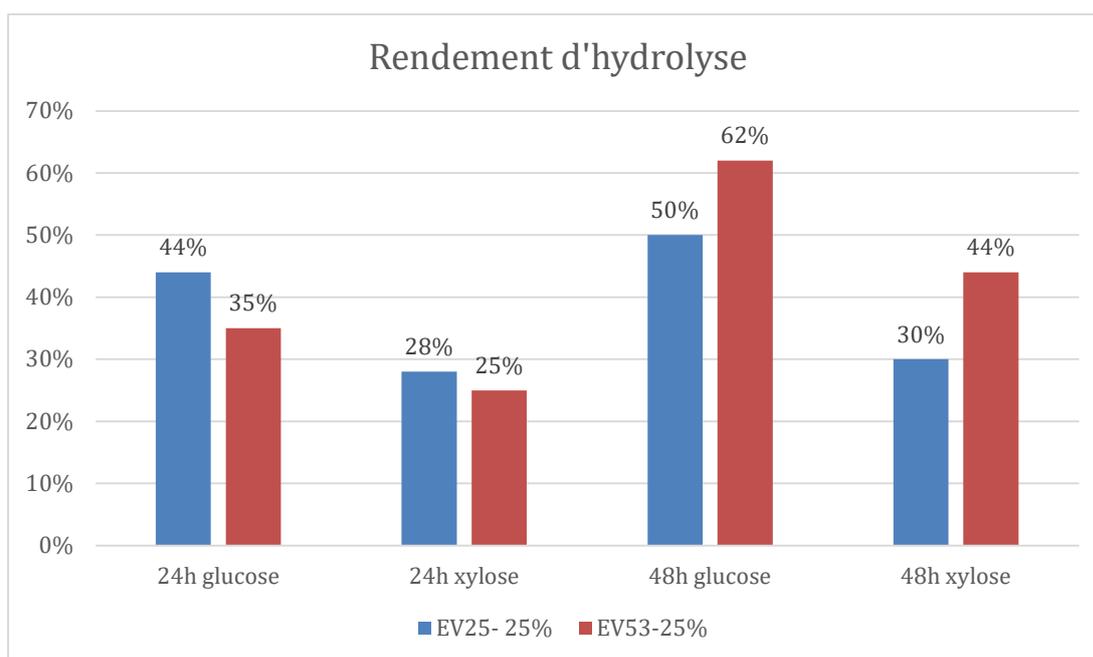


Figure 94. Rendement d'hydrolyse en pourcentage. Comparaison entre le substrat prétraité à l'échelle laboratoire (Ctec2 10FPU/g) et celui prétraité à l'échelle pilote (Ctec2 15FPU/g).

A partir de ce même bioextrudat, nous avons rempli le bioréacteur dédié avec 99 kg de mout à 18.5% de matière sèche ce qui équivaut à l'ajout de 66 kg de bioextrudat prétraité (27.3% matières sèches en sortie d'extrudeur) dilué avec 30 kg d'eau distillée.

Après inoculation, nous avons suivi la réaction en effectuant des prélèvements 2 fois par jour.

Nous avons pu observer une consommation rapide du glucose et du xylose au fur et à mesure de leur apparition (concentrations résiduelles pratiquement nulles) et une forte production d'éthanol dès les premières 24h. La concentration en éthanol se stabilise aux environs de 28g/L au bout de 65h pour finir par diminuer progressivement à 22.5 g/L à 160h. Nous attribuons cette diminution de la concentration d'éthanol à une évaporation de celui-ci, la réaction s'effectuant à 30°C avec un réacteur dont le couvercle non hermétique reste ouvert, nous avons émis une recommandation pour l'utilisation d'un condenseur en sortie de réacteur en vue de limiter grandement cette évaporation.

Les résultats présentés ici équivalent à un rendement de production de 173 litres d'éthanol produits par tonne de biomasse, ce qui est comparable à ce que nous avons pu observer à l'échelle laboratoire en bioréacteur de 5L d'une part puis toujours à l'échelle laboratoire lors de nos essais couplage extrusion/fermentation sur les installations du LCA.

Tableau 25. Résultats des expériences de couplage extrusion/fermentation à l'échelle pilote.

SCC	Couplage Pilote
Taux de matière sèche %	18,5
Concentration finale EtOH g/L	28
Xylose résiduel g/L	1,7
Rendement en Litre/ Tonne de biomasse	173

Ces travaux nous ont permis de confirmer la viabilité de notre procédé complet et de démontrer que l'augmentation en taille ne se traduisait pas par une diminution drastique du rendement de production éthanol. Nos résultats antérieurs sur nos installations à l'échelle laboratoire nous ont permis de comprendre et d'adapter le système en limitant les concentrations en sels inhibiteurs ce qui a permis d'atteindre une consommation optimale du xylose et donc une concentration résiduelle finale inférieure à 2g/L. Plusieurs axes d'amélioration ont aussi pu être identifiés, notamment la nécessité d'utiliser un réacteur hermétique disposant d'un condenseur en vue de limiter l'évaporation de l'éthanol. Grâce à ces expériences, une étape importante a pu être franchie pour le projet BABETREAL5 en le faisant passer au niveau TRL5-6 (Validation dans un environnement significatif du composant ou de l'artefact produit).

Nous avons aussi démontré, et ce pour la première fois, la faisabilité du procédé global en couplant un extrudeur bi-vis à un bioréacteur et en effectuant le prétraitement suivi de la saccharification et de la fermentation (SSCF) tout en conservant les performances obtenues en laboratoire, nous permettant d'atteindre des concentrations en éthanol supérieures à 40g/L. Nous avons également pu transposer cette conduite de procédé à l'échelle pilote en multipliant par 10 environ la taille des équipements utilisés, et ce en maintenant des performances proches de l'échelle laboratoire.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Adeboye, P. T., Bettiga, M., & Olsson, L. (2014). The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express*, 4(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0046-7>
- Aldiguier, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E., & Molina-Jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(4), 217–222. <https://doi.org/10.1007/s00449-004-0352-6>
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(4), 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Alvira, P., Negro, M. J., Ballesteros, I., González, A., & Ballesteros, M. (2016). Steam Explosion for Wheat Straw Pretreatment for Sugars Production. *Bioethanol*, 2(1), 66–75. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0003>
- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/membr.00042-09>
- Aslankoochi, E., Rezaei, M. N., Vervoort, Y., Courtin, C., & Verstrepen, K. (2015). Glycerol Production by Fermenting Yeast Cells Is Essential for Optimal Bread Dough Fermentation. *PLoS ONE*, 10, e0119364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119364>
- Avcı, A., Saha, B. C., Kennedy, G. J., & Cotta, M. A. (2013). Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Bioresource Technology*, 142, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.002>
- Baker, A. A., Helbert, W., Sugiyama, J., & Miles, M. J. (2000). New insight into cellulose structure by atomic force microscopy shows the I(α) crystal phase at near-atomic resolution. *Biophysical Journal*, 79(2), 1139–1145. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76367-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76367-3)
- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6(DEC), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., & Garrido-Fernandez, A. (2008). Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.7.1412>
- 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(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bouvier, J. M., & Campanella, O. H. (2014). Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials. *Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials*, 97814443338(1983), 1–518. <https://doi.org/10.1002/9781118541685>
- Brat, D., Boles, E., & Wiedemann, B. (2009). Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2304–2311. <https://doi.org/10.1128/AEM.02522-08>
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
- CARPITA, N., SABULARSE, D., MONTEZINOS, D., & DELMER, D. P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science*, 205(4411), 1144 LP – 1147. <https://doi.org/10.1126/science.205.4411.1144>
- 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(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-83>
- Casey, G. P., & Ingledew, W. M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(3), 219–280. <https://doi.org/10.3109/10408418609108739>
- Cassells, B., Karhumaa, K., Sánchez I Nogué, V., & Lidén, G. (2017). Hybrid SSF/SHF Processing of SO₂ Pretreated Wheat Straw-Tuning Co-fermentation by Yeast Inoculum Size and Hydrolysis Time. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(2), 536–547. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2229-y>
- 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. In *Bioresource Technology* (Vol. 264, pp. 370–381). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Romani, A., Thevelein, J. M., & Domingues, L. (2019). Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>

- da Costa Nogueira, C., de Araújo Padilha, C. E., de Jesus, A. A., de Santana Souza, D. F., de Assis, C. F., de Sousa Junior, F. C., & dos Santos, E. S. (n.d.). Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. In *Industrial crops and products: Vol. v. 130*. Elsevier B.V.
- Davidson, T. C., Newman, R. H., & Ryan, M. J. (2004). Variations in the fibre repeat between samples of cellulose I from different sources. *Carbohydrate Research*, 339(18), 2889–2893. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.005>
- de Souza, W. R. (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. <https://doi.org/10.5772/54325>
- de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(4), 497–522, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>
- Del Carmen Fong Lopez, M., Rigal, M., Rigal, L., Vilarem, G., & Vandebossche, V. (2019). Influence of temperature and soda concentration in a thermo-mechano-chemical pretreatment for bioethanol production from sweet corn co-products. *Industrial Crops and Products*, 133, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.044>
- Digman, M. F., Shinnars, K. J., Casler, M. D., Dien, B. S., Hatfield, R. D., Jung, H. J. G., Muck, R. E., & Weimer, P. J. (2010). Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(14), 5305–5314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.014>
- Ding, M.-Z., Wang, X., Yang, Y., & Yuan, Y.-J. (2011). Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 15(10), 647–653. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0003>
- 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*, 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. (2014a). 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., González, A., & Ballesteros, M. (2014b). 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>
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C. (2013). Yeast: World's Finest Chef. *Food Industry, May 2014*. <https://doi.org/10.5772/53156>
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure,

- organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1298–1315. <https://doi.org/10.1002/bit.22256>
- 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 BT - Green Fuels Technology: Biofuels* (C. R. Soccol, S. K. Brar, C. Faulds, & L. P. Ramos (eds.); pp. 147–173). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_7
- Fong, M. (2019). *Développement d'un procédé de dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique mettant en œuvre des moyens thermo-mécano-chimiques*. Umr 5215.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- Gatt, E., Khatri, V., Bley, J., Barnabé, S., Vandenbossche, V., & Beauregard, M. (2019). Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: New insights into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules. *Bioresource Technology*, 282, 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.045>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gibson, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(76), 2749–2766. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0341>
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Han, M., Kim, Y., Cho, W. S., Choi, G. W., & Chung, B. W. (2016). An integrated process for continuous cellulosic bioethanol production. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33(1), 223–229. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0121-z>
- Hara, K. Y., Kobayashi, J., Yamada, R., Sasaki, D., Kuriya, Y., Hirono-Hara, Y., Ishii, J., Araki, M., & Kondo, A. (2017). Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast Research*, 17(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox061>
- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: Current state, challenges, and opportunities. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 9, Issue 18, p. 3721). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app9183721>

- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, *315*(5813), 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- 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*(18), 8940–8948. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.015>
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *66*(2), 300–372. <https://doi.org/10.1128/membr.66.2.300-372.2002>
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *583*(24), 4025–4029. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>
- Jin, M., & Dale, B. E. (2018). *AFEX™ Pretreatment-Based Biorefinery Technologies BT - Handbook of Biorefinery Research and Technology* (J. M. Park (ed.); pp. 1–16). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6724-9_2-1
- Jönsson, L. J., Alriksson, B., & Nilvebrant, N. O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- 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>
- Karhumaa, K., Garcia Sanchez, R., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2007). Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *6*, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-5>
- Karunanithy, C., & Muthukumarappan, K. (2010). Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*(1), 264–279. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8757-y>
- Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *199*, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, *44*(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kumagai, A., Kawamura, S., Lee, S.-H., Endo, T., Rodriguez, M. J., & Mielenz, J. R. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing for Hinoki cypress and Eucalyptus after fibrillation by steam and subsequent wet-disk milling. *Bioresource Technology*, *162*, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.110>
- Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Op den Camp, H. J. M., van Dijken, J.

- P., & Pronk, J. T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research*, 4(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00141-7)
- Kuyper, M., Hartog, M. M. P., Toirkens, M. J., Almering, M. J. H., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2005). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.010>
- Lee, S.-M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2012). Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5708–5716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01419-12>
- 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(February), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.088>
- Liu, Z.-H., Qin, L., Zhu, J.-Q., Li, B.-Z., & Yuan, Y.-J. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0167-x>
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. F. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 539–550. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x>
- Maiorella, B. L., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1984). Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(10), 1155–1166. <https://doi.org/10.1002/bit.260261004>
- Marriott, P. E., Gómez, L. D., & Mcqueen-Mason, S. J. (2016). Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytologist*, 209(4), 1366–1381. <https://doi.org/10.1111/nph.13684>
- Modenbach, A., & Nokes, S. (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>
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., Fernández, J. L., & Ballesteros, M. (2013). Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces*-Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.006>

- Moreno, A. D., Tomás-Pejó, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., & Olsson, L. (2013). Fed-batch SSCF using steam-exploded wheat straw at high dry matter consistencies and a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain: Effect of laccase supplementation. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-160>
- Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231–241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00352.x>
- Nixon, B. T., Mansouri, K., Singh, A., Du, J., Davis, J. K., Lee, J. G., Slabaugh, E., Vandavasi, V. G., O'Neill, H., Roberts, E. M., Roberts, A. W., Yingling, Y. G., & Haigler, C. H. (2016). Comparative Structural and Computational Analysis Supports Eighteen Cellulose Synthases in the Plant Cellulose Synthesis Complex. *Scientific Reports*, 6(June), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep28696>
- Offiah, V., Kontogiorgos, V., & Falade, K. O. (2019). Extrusion processing of raw food materials and by-products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(18), 2979–2998. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1480007>
- 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(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Olofsson, K., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2010). Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 17. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-17>
- Olofsson, K., Rudolf, A., & Lidén, G. (2008). Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2008.01.004>
- Olson, D. G., McBride, J. E., Joe Shaw, A., & Lynd, L. R. (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.026>
- Palmqvist, B., & Lidén, G. (2014). Combining the effects of process design and pH for improved xylose conversion in high solid ethanol production from *Arundo donax*. *AMB Express*, 4, 41. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0041-z>
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Parisutham, V., Kim, T. H., & Lee, S. K. (2014). Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*, 161, 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>
- Patel, M. A., Ou, M. S., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2005). Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose

- and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1453–1460. <https://doi.org/10.1021/bp0400339>
- Patiño, M. A., Ortiz, J. P., Velásquez, M., & Stambuk, B. U. (2019). d -Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* : A review. *Yeast*, 36(9), yea.3429. <https://doi.org/10.1002/yea.3429>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Peña, A., Sánchez, N. S., Álvarez, H., Calahorra, M., & Ramírez, J. (2015). Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fou005>
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C. A., Hallett, J. P., & Liotta, C. L. (2006). From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production. *Industrial Biotechnology*, 2(1), 55–65. <https://doi.org/10.1089/ind.2006.2.55>
- 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(1–2), 29–60. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>
- Romaní, A., Garrote, G., & Parajó, J. C. (2012). Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading. *Fuel*, 94, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.013>
- Sakimoto Kouki A4 - Kanna, Machi A4 - Matsumura, Yukihiko, K. A.-S. (2017). Kinetic model of cellulose degradation using simultaneous saccharification and fermentation. *Biomass and Bioenergy*, v. 99, 116-121–2017 v.99. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.02.016>
- Schuster, B. G., & Chinn, M. S. (2013). Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Feedstocks for Ethanol Fuel Production. *BioEnergy Research*, 6(2), 416–435. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9278-z>
- Seike, T., Kobayashi, Y., Sahara, T., Ohgiya, S., Kamagata, Y., & Fujimori, K. E. (2019). Molecular evolutionary engineering of xylose isomerase to improve its catalytic activity and performance of micro-aerobic glucose/xylose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1474-z>
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 985685. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., & Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.006>
- Siriwong, T., Laimeheriwa, B., Aini, U. N., Cahyanto, M. N., Reungsang, A., &

- Salakkam, A. (2019). Cold hydrolysis of cassava pulp and its use in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process for ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, 292, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.003>
- Söderström, J., Galbe, M., & Zacchi, G. (2005). Separate versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Two-Step Steam Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 25(3), 187–202. <https://doi.org/10.1080/02773810500191807>
- Sonnleitner, B., & Käppeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(6), 927–937. <https://doi.org/10.1002/bit.260280620>
- Sreenath, H. K., & Jeffries, T. W. (2000). Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technology*, 72(3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00113-3)
- Stenberg, K. (1999). *Ethanol from softwood: Process development based on steam pretreatment and SSF*. [http://portal.research.lu.se/portal/en/publications/ethanol-from-softwood--process-development-based-on-steam-pretreatment-and-ssf\(5e5b442e-4ef2-46a6-bc17-bd39d2fd4f11\).html](http://portal.research.lu.se/portal/en/publications/ethanol-from-softwood--process-development-based-on-steam-pretreatment-and-ssf(5e5b442e-4ef2-46a6-bc17-bd39d2fd4f11).html)
- Sun, S., & Heitman, J. (2011). Is sex necessary? In *BMC biology* (Vol. 9, p. 56). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-56>
- Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Siika-aho, M., Niku-Paavola, M.-L., Viikari, L., & Buchert, J. (2000). Trichoderma reesei cellulases and their core domain in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose*, 7, 189–209. <https://doi.org/10.1023/A:1009280109519>
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s002530000328>
- Tavva, S. S. M. D., Deshpande, A., Durbha, S. R., Palakollu, V. A. R., Goparaju, A. U., Yechuri, V. R., Bandaru, V. R., & Muktinutalapati, V. S. R. (2016). Bioethanol production through separate hydrolysis and fermentation of *Parthenium hysterophorus* biomass. *Renewable Energy*, 86, 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.074>
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2011). *Chapter 7@_ Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion*.
- Tomás-Pejó, E., Ballesteros, • M, Oliva, • J M, & Olsson, • L. (2010). *Adaptation of the xylose fermenting yeast Saccharomyces cerevisiae F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes*. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0768-8>
- Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A. (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, 242, 125080. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125080>

- Van Soest, P. J., & 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.
- 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., Doumeng, C., & Rigal, L. (2014). Thermomechanical and Thermo-mechano-chemical Pretreatment of Wheat Straw using a Twin-screw Extruder. *BioResources*, *9*(1), 1519–1538. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.1519-1538>
- Verduyn, C., Zomerdijk, T. P. L., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *19*(3), 181–185. <https://doi.org/10.1007/BF00256451>
- Weiss, N. D., Felby, C., & Thygesen, L. G. (2019). Enzymatic hydrolysis is limited by biomass-water interactions at high-solids: Improved performance through substrate modifications 09 Engineering 0904 Chemical Engineering 09 Engineering 0915 Interdisciplinary Engineering. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1339-x>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017a). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 71, pp. 475–501). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017b). 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>
- Zacchi, G., & Axelsson, A. (1989). Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, *34*(2), 223–233. <https://doi.org/10.1002/bit.260340211>
- Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*(1–2), 17–34. <https://doi.org/10.1007/s002530100624>
- Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V., & Wang, D. (2016). Optimization of Bioethanol Production Using Whole Plant of Water Hyacinth as Substrate in Simultaneous Saccharification and Fermentation Process. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01411>
- Zhang, Y., Dubé, M. A., McLean, D. D., & Kates, M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, *89*(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00040-3)

- Zhang, Y. H. P., Ding, S. Y., Mielenz, J. R., Cui, J. B., Elander, R. T., Laser, M., Himmel, M. E., McMillan, J. R., & Lynd, L. R. (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *97*(2), 214–223. <https://doi.org/10.1002/bit.21386>
- Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *6*(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Zheng, J., & Rehmann, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18967–18984. <https://doi.org/10.3390/ijms151018967>

9.ANNEXES

Le projet BABETREAL 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., Mexique
- INSAT-TBI (Institut National de Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse biotechnology institute), 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

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM SWEET CORN COPRODUCT BY A CONTINUOUS PRETREATMENT INVOLVING BIOEXTRUSION AND SUBSEQUENT SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND CO-FERMENTATION

A. Fougereuse^{*a}, M. Del Carmen Fong Lopez^b, M. Rigal^b, L. Rigal^b, G.Vilarem^b, E. Lombard^a, S. Guillouet^a, V. Vandenbossche^b, X. Cameleyre^a

a : TBI, Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering, INSA UMR INSA/CNRS 5504, UMR INSA/INRA 792, 135 Avenue de Rangueil, 31077 TOULOUSE CEDEX 4

b : Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRAE, Toulouse, France.

*Corresponding author

Declarations of interest: none

KEYWORDS:

Alkaline pretreatment; Extrusion; Continuous process; Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation; Bioethanol

ABSTRACT:

In order to reduce our carbon footprint, a race for low carbon biofuels is ongoing. Second generation ethanol can be a key component of attaining our target, but several hurdles must be overcome.

This work demonstrates, for the first time, the feasibility of our compact, all-in-one technology, able to pretreat lignocellulosic biomass and transform C5 and C6 sugars into ethanol in a one-stage reactor. Sweet corn residue was pretreated in a twin-screw extruder combining thermo-mechano-chemical and bio-catalytic action. The biomass was subjected to an alkaline pretreatment followed by a neutralization step and the action of an enzymatic cocktail before fermentation by a C5-C6 co-consuming yeast, leading to the production of 160 litres of ethanol/ton of biomass. Furthermore, we were able to improve the performance of the process by 20% by reducing the

quantities of salts present in the slurry, paving the way for a better understanding and future improvements.

1. INTRODUCTION

As our environmental impact on the planet becomes more and more concerning, nations are looking to reduce their carbon footprint in every possible way. Transportation, which accounts for more than 22% (2014 and rising, *Source: International Energy Association.*) of global greenhouse gas emissions, is a good candidate, thus, many governmental policies are encouraging the development of sustainable sources for transport energy. The European Commission has set a target of 14% of transport energy consumption from renewable sources in each EU country by 2030, with a 3.5% target for advanced biofuels.

Bioethanol, an oxygenated biofuel with a higher octane number than gasoline, is a great alternative (Zabed et al., 2017b). Its use has risen in many countries, with first generation bioethanol typically being blended with gasoline at around 5-10%.

The major drawback regarding first generation ethanol is the use of arable land for biofuel crops instead of food crops. In order to overcome this problem, bioethanol can be produced from lignocellulosic biomass, thus not competing with food crops. According to (Chandel et al., 2018), this technology has the potential to reach sustainability and commercialization in the next few years.

However, in order to attain these objectives, major hurdles must be overcome. These include pretreatment steps, efficient hydrolysis of the complex sugars, as well as fermentation of the released sugars - especially xylose.

Lignocellulose is one of the most abundant renewable biopolymers on earth (Festucci-Buselli et al., 2007); it is composed mainly of polymerized carbohydrates, cellulose and hemicelluloses, which differ in proportions depending on the type of biomass. However, these polymers are not easily accessible, as they are bound tightly with lignin. Hence, a depolymerization process is needed in order to effectively reduce these polymers into their constituent sugars using enzymatic hydrolysis, resulting in fermentable C6 sugars from cellulose and C5 sugars from hemicelluloses. This depolymerization can be achieved by different methods, including thermal, chemical or physical treatments.

During the last decade, a large variety of pretreatments have been developed and an abundance of reviews about their strengths and drawbacks can be found (Zabed et al., 2017a). Considering the vast choice of biomass available, not one technology had risen above the others. Despite this, Vandenbossche et al., 2014 showed that extrusion can be a good candidate for producing a sustainable second-generation bioethanol. Extrusion has proven to be very efficient and adapted to different biomass (Del Carmen Fong Lopez et al., 2019). During extrusion, biomass is subjected to different effects that combine and ultimately depolymerize the complex

structure of lignocellulose and make carbohydrates available to enzymatic degradation. More specifically, biomass in the extruder is subjected to mechanical and thermal treatment in combination with chemical and biological agents that, all together, prepare the biomass for further processing.

In this study, the use of a compact and quick pretreatment - namely twin-screw extrusion - has proven to be an effective way of reducing cost and environmental impact of the process. Our technology employs twin-screw extrusion in combination with an alkaline agent (NaOH) followed by a neutralization step with H₂SO₄. Furthermore, using a reverse screw profile allowed for a further filtration step, eliminating a good portion of the salts and stabilizing the dry matter at an appropriate ratio. After these steps, the biomass was treated with an enzymatic cocktail (cellulosic enzymatic cocktail), incorporating thorough mixing of the enzymes even at a high solid ratio. As shown by E. Gatt et al., 2019, the saccharification process starts quickly inside the extruder. This bioextrudate can then be transferred into a bioreactor, where the hydrolysis of cellulose and hemicelluloses occurs. In order to render this process economically viable, it is necessary to focus on high solids loading of 20% dry matter or more. A final concentration of at least 4%(w/w) EtOH at the end of the process is needed for efficient distillation.

Saccharomyces cerevisiae, the most commonly used microorganism for bioethanol production, is not able to convert xylose to ethanol (Zaldivar et al., 2001). In the past few years, modified strains that can co-consume xylose and glucose have become available (Patiño et al., 2019), allowing for better performance in bioethanol production, given that a substantial amount of the sugar released during the saccharification phase is xylose.

Furthermore, various improvements in cellulose ethanol technology have led to better performances and more flexibility (Cassells et al., 2017) (B. Palmqvist & Lidén, 2014), among which simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) is an example (Olofsson, Rudolf, et al., 2008). The use of a single bioreactor to perform enzymatic hydrolysis and fermentation has shown great promise, not only reducing the cost and time of the process, but also allowing a better saccharification due to the consumption of end products, thus limiting inhibition (Olofsson, Bertilsson, et al., 2008). In this work, Lesaffre commercial strain CelluX 4™ was used to perform a simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) in a bioreactor following a continuous twin-screw extrusion pretreatment in order to attain a high concentration of ethanol from Sweet Corn Residues.

This study demonstrates the feasibility of this combined process of twin screw bioextrusion and SSCF, giving an all-in-one compact process unit for converting lignocellulosic biomass to bioethanol, while reducing the number of bioreactor and process steps. The first part of this work focuses on the optimization of productivity, leading to an investigation of the role of salts on the overall process. Interestingly, Casey et al., (2013) previously described the impact of salts on the overall yield of

fermentation and especially on the consumption of xylose by genetically modified saccharomyces. By reproducing their methods, this study confirms the impact of salts in the abovementioned process using CelluX 4™ and pretreated Sweet Corn Cob (SCC). Lastly, several proposals are made in order to overcome the negative effects of salts and to improve the overall productivity of this innovative all-in-one process.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

In this study, dehydrated sweet corn (*Zea mays* L. *saccharata*) coproducts from the canning industry in Southwest France were used, hereafter referred to as Sweet Corn Cob (SCC). It was provided by SARL Soupro (Castelmoron sur Lot, France) and milled using a hammer mill with a 6mm grid. The biomass was then stored in a plastic container at room temperature.

The enzymatic cocktail employed in the bioextrusion was Cellic® Ctec 2, kindly provided by Novozymes (Franklinton, USA). The protein content was determined using the Lowry method (Biorad Protein assay kit) and cellulase activity was determined using the method reported by Ghose (Ghose, 1987). The protein content of Cellic® Ctec 2 was 254.9 g/L and the cellulase activity was 123.3 FPU/mL. The enzymatic cocktail was diluted into a citrate-phosphate buffer at pH 5.0 and 5.0 mM at a buffer-to-cocktail ratio of 4.9 Kg/Kg.

2.2 Twin screw extruder

The integrated alkaline pretreatment, neutralization and impregnation were performed in a laboratory scale extruder (Evoluum 25, Clextal, France). The co-penetrating and co-rotating twin screw extruder was composed of 10 modules with a length of 100mm each.

A schematic representation of the screw profile, barrel temperature set point for each module and pump connection locations is shown in Figure 1. The screw profile employed in the present work is adapted from a previous study by Vandebossche et al. (Vandebossche et al., 2014, 2016). The feeding zone comprises a series of trapezoidal double-thread screws for transport of the biomass. Mixing of the chemical catalysts into the biomass was carried out by alternating bilobed paddles and conveying screws. Use of these types of screws in biomass pretreatment has shown to improve enzymatic digestion by leading to the formation of pores at the biomass surface (Zheng et al., 2015). In the design, the presence of a reversed pitch double-thread screw results in shearing force, leading to the formation of a dynamic plug for filtration. The mechanical force applied by the reverse screw pressures the biomass,

forming a dynamic plug and producing a liquid/solid separation. Thus, a filtrate containing salts and solubilized biomass components was recovered in module 6. The filter section consists of six hemispherical dishes with conical holes of 1mm.

Fig 1.

The modules were thermoregulated by a heating band and cooled by water circulation; modules 1, 6 and 10 were not subjected to heat regulation. Two internal temperature probes were used: in module 3 (TP1) and module 8 (TP2). The barrel temperature of modules 3 and 4, where the alkali pretreatment takes place, were set to 140°C in order to obtain an internal temperature of around 136°C (TP1). The barrel temperature in subsequent modules after alkaline pretreatment was set to gradually cool the matter, to attain a biomass temperature of around 45°C in module 7 (TP2). The set temperature prevents degradation and/or deactivation of the enzymes and ensures the introduction of enzymes at their optimum working temperature.

Feedstock was introduced into the extruder's first module using a feeder model number KCL-KT20 (K-tron, Clextal, France). The feeder screw continuously discharged the sweet corn coproduct at 1.6 Kg/h to obtain 1.44 Kg of dry sweet corn co-product per hour. The twin screws were set to rotate at 300 rpm. Solutions of sodium hydroxide (NaOH), sulfuric acid (H₂SO₄) and enzymatic cocktail were injected by 3 different piston pumps (DKM SUPER J PP 6.35, DKM SUPER K PP 16, PMRD13493 SM 70, Clextal, France).

2.3 Alkaline thermo-mechano-chemical pre-treatment and neutralization phase

The alkaline pretreatment was performed with sodium hydroxide (NaOH) and the neutralization phase with sulfuric acid (H₂SO₄). The alkaline pretreatment conditions were adapted from previous studies and corresponded to optimized conditions: NaOH/SCC ratio of 6.5 (% w/w) and an internal temperature of 130°C (Del Carmen Fong Lopez et al., 2019). The Liquid/Solid ratios (L/S; a and b) were also adapted from previous studies. Both NaOH and H₂SO₄ pumps were fixed to maintain liquid-to-solid ratios of 1.1 (Kg/Kg) in the alkaline step and 4.6 (Kg/Kg) in the acid introduction step, which correspond to a flow rate of 1.65kg/h and 5.80 Kg/h, respectively. The pH of the pretreated biomass was analyzed to ensure that the biomass was neutralized; the target pH of extrudate and filtrate was 5 and 4, respectively. The conditions employed ensure a rapid neutralization of the extrudate and an efficient filtration.

2.4 Bioextrusion

Bioextrusion is a term employed for the introduction of enzymes into the extruder. In this case, the enzymatic cocktail applied was Cellic® Ctec 2 (Novozyme Corp). The enzymatic cocktail was first diluted in a citrate-phosphate buffer, at a ratio of 1 g of enzyme to 4.9g of buffer. The L/S ratio and enzymatic loading of bioextrusion was studied in unpublished work. High enzyme loading (15.7 FPU/g of dry extrudate; 42.1 FPU/g of cellulose; 1298 IU/g of dry extrudate; 3492 IU/g of hemicelluloses) was applied in this test in order to ensure a complete saccharification of the substrate (32.4 mg of protein/ g of dry extrudate). These parameters allowed a production of 4.2Kg/h of bioextrudate at 27.7% of dry matter.

2.5 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF)

2.5.1 Pilot scale reactor

The SSCF was performed in a bioreactor (Solaris, Italy) of 22.5L (useful volume). The reactor was designed with a side inlet for direct connection with the twin-screw extruder. Agitation was ensured by 2 types of stirring blades: one stirring blade at the bottom of the tank and 2 sets of “marine propeller” type stirring blades. The reactor was also designed to perform sterilization at high pressure. It was equipped with internal pH and temperature probes.

2.5.2 Lab scale reactor

Laboratory scale experiments were performed in 5L bioreactors (Sartorius Biostat B). Agitation was ensured using 2 sets of “marine propeller” stirring blades. The reactor was equipped with internal pH and temperature control and regulation.

2.5.3 Yeast strain

Saccharomyces cerevisiae CelluX 4™ was kindly provided by Lesaffre (www.lesaffreadvancedfermentations.com). CelluX 4™ is a GMO strain of *Saccharomyces cerevisiae* that has been developed for the cellulosic ethanol industry. This strain has a strong tolerance to inhibitors and has the capacity to co-ferment glucose and xylose. The metabolic pathway for the consumption of xylose is cofactor independent, due to the expression of xylose Isomerase from *Clostridium phytofermentans* directly converting xylose to xylulose, which can then enter the pentose phosphate pathway to ultimately produce ethanol.

2.5.4 Precultures

To prepare the inoculum, a colony of plated CelluX 4™ was used to inoculate 30ml YPX media (1% yeast extract, 2% peptone, 2% xylose) in 250 ml baffled Erlenmeyer flasks. The culture was incubated aerobically for 24h in an orbital shaker set at 30°C and 120 rpm.

These cultures were then used to inoculate 270ml of Synthetic medium in 2000ml Erlenmeyer flasks which were incubated aerobically for 12h in an orbital shaker set at 30°C and 120 rpm. Synthetic mineral medium was prepared as follows (all concentrations in g L⁻¹): KH₂PO₄, 3.0; (NH₄)₂SO₄, 3.0; Na₂HPO₄ 12H₂O, 3.0; sodium glutamate, 1.1; MgSO₄ 7H₂O, 0.5; ZnSO₄ 7H₂O, 0.04; MnSO₄ H₂O, 0.0038; CoCl₂ 6H₂O, 0.005; CuSO₄ 5H₂O, 0.009; Na₂MoSO₄ 2H₂O, 0.006; CaCl₂ 2H₂O, 0.023; (NH₄)₂Fe(SO₄)₆ 6H₂O, 0.023; H₃BO₃, 0.003; pantothenate, 0.0024; nicotinic acid, 0.002; meso-inositol, 0.05; thiamine, 0.002; pyridoxine, 0.002; para-aminobenzoic acid: 0.0004, and biotin, 0.00012. These precultures were used to inoculate every SSCF experiments with 10% (v/v). To ensure a good start, Yeast Extract was used at 2g/Kg of wort in every experiment.

2.5.5 SSCF in pilot scale reactor

High ethanol concentrations are required in order to decrease distillation cost. It is therefore necessary to perform the saccharification and fermentation with high dry matter. The reactor was fed for approximately 2.5h with bioextrudate at a flow rate of around 10 Kg/h, equal to 4.2 Kg/h dry matter. During the loading phase, Citrate-Phosphate buffer (0.15Molar, pH5.0) or demineralized water was added every 10 min in order to maintain a consistency as close as possible to 20% (w/w). The temperature in the bioreactor was set at 45°C for 2h from the beginning of the filling then reduced to 30°C before the inoculation. Once the filling phase was completed, the inoculation was initiated with 10% of the total volume of CelluX 4™ preculture (DO 600nm of around 5). The agitation was kept constant at 200 rpm and the fermentation was carried out for 7 days; samples were taken regularly. After 7 days of fermentation, the mash was recovered and weighed, then filtered through a 1mm mesh. The fraction retained by the mesh was recovered and dried out and the filtered fraction was centrifuged at 10000g during 10 min at 10°C. The dry matter of both supernatant and the sediment was also determined.

2.6 Analytical methods

2.6.1 Dry matter and parietal compounds

Dry matter was determined according to the French Standard NF V 03-903 and mineral content according to the French standard NF V 03-322. An estimation of the three parietal constituents (cellulose, hemicelluloses, and lignin) contained in the

solids, was made using the ADF-NDF method of (Van Soest & Wine, 1968). All determinations have been carried out in triplicate and standard deviation was less than 1.5% for all measurements.

2.6.2 Total sugar analysis

Total sugars were determined after acid hydrolysis. 100 mg of biomass was pre-impregnated with 1.25 ml of 72% H₂SO₄ for 30min at room temperature. Then, 13.5mL of water was added to the sample and placed in a shaking water bath at 90°C for 180 min. The hydrolysis reaction kinetic was analyzed by taking samples at 30, 60 and 90 min. After cooling, samples were neutralized with NaOH 32% (m/v), diluted and filtered (0.25µm). An analysis was then performed using high performance Ionic chromatography HPLIC (DIONEX ICS-3000 coupled with pulsed amperometric detection (PAD) and fitted with a Carbopac PA1 column).

2.6.3 Sample analysis

The samples from the bioreactor were centrifuged at 4000g for 10min, the supernatant was filtered through a 0.45µm filter and analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The glucose, xylose, ethanol and glycerol analyses were performed with an Aminex HPX-87H column (Biorad), a pre-column, a gradient pump and a refractive index detector. The flow rate of the mobile phase (H₂SO₄ 5mM) was 0,5mL/min and the HPLC column temperature was 50°C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Vandenbossche et al. (2014, 2016) and Duque et al., 2014 have demonstrated in previous years the effectiveness of a thermo-mechano-chemical action combined with a biological action. More specifically, they studied enzymatic hydrolysis in combination with a twin-screw extruder for the deconstruction of lignocellulosic biomass. The current work elaborates on previous studies by successfully combining the abovementioned treatment with SSCF in a pilot scale reactor by coupling a bioreactor at the end of the extruder to produce ethanol. Among potential industrial feedstocks, dehydrated sweet corn (SCC) was chosen as a model lignocellulosic biomass.

After demonstrating the feasibility of coupling these two steps, a study on the optimization of yields was carried out.

3.1 Characterization of raw and pretreated biomass

The raw sweet corn coproduct is characterized by high levels of cellulose (41%/IF) and hemicellulose (53%/IF), as well as low levels of lignin (6%/IF) (table 1). SCC hemicellulose contains primarily xylose with a minor amount of arabinose and

galactose released after hydrolysis. The alkaline thermo-mechano-chemical pretreatment, followed by neutralization and filtration, leads to an extrudate, which is possible to collect before enzyme addition. Extrudate dry matter, which was close to 34%, reflects an effective filtration. The composition of this extrudate showed a loss of hemicellulose and lignin during the pretreatment phase leading to an increase in the proportion of cellulose in the pretreated biomass, reaching 48%/IF. After enzyme addition, bioextrudate was analyzed before its introduction into the bioreactor. The insoluble fiber content decreased to 44% DM in the bioextrudate and reflects the start of saccharification in the extruder before introduction into the bioreactor. Saccharification begins with the fragmentation of hemicellulose, resulting in a reduction in the proportion of hemicellulose in the insoluble fiber of bioextrudate (34% IF).

Table 1.

3.2 Hydrolysis

The pretreatment was performed using the abovementioned parameters and the enzymatic cocktail Cellic® Ctec 2 at a concentration of around 15FPU/g of biomass. The bioextruded SCC was then collected and hydrolysis was performed at 50°C for 96h in small laboratory bioreactors (1L).

Fig 2.

As expected, glucose and xylose concentrations increased throughout the hydrolysis reaction. It should be noted that most of the hydrolysis (85%) occurred after 24h of reaction time.

At 96h the reaction was nearly complete, with most of the hydrolysable sugar released. The hydrolysis yield was 65% for glucose which is a relatively high yield considering the recalcitrance of lignocellulosic biomass.

The hydrolysis yield of xylose was relatively low, as only 30% of the hemicellulose was hydrolyzed at 96h.

These results indicate that there is room for improvement in terms of pretreatment to help the enzymatic cocktail achieve its desired function.

3.3 Saccharification and fermentation in bioreactor

Using the abovementioned parameters, bioextrusion followed by simultaneous saccharification and cofermentation was performed, using buffer to dilute the bioextruded SCC to 20%.

The pretreated biomass mixed with the enzymatic cocktail, called bioextrudate, was injected into the side of the bioreactor. This bioextrudate contained approximately 62 % (w/w) of humidity and 8Kg was added in the bioreactor in order to attain a concentration of 20% pretreated biomass (w/w).

Citrate-phosphate buffer (0.15M, pH5) was added to the mix to attain a ratio of 20% dry matter.

The final dry matter reached 19% (w/w), instead of the target 20%, due to the fluctuating nature of the pretreatment.

The biomass was then subjected to immediate saccharification, converting the cellulose into glucose and the hemicellulose into xylose. These sugars are directly consumed by CelluX 4 yeast and transformed in ethanol.

Fig 3.

The yeast performed well during the assay; consuming glucose at a relatively high rate. The final concentration of ethanol produced was 31g/L. The consumption of xylose was low, and in the end, a residual xylose concentration of a little less than 10g/L was observed.

According to a hydrolysis assay that was conducted on similar bioextrudate, a hydrolysis yield of about 65% of glucose and 29% of xylose at 96h (fig 3.) was to be expected.

Using these figures, it is possible to estimate that 35g/L of ethanol can be produced from the sugars released during saccharification. Considering this result, the ethanol yield (g EtOH/g consumed sugars) was close to 90% of the maximum theoretical yield (0.45g/g out of 0.51g/g).

This indicates that the production of ethanol was around 160 Liter of ethanol produced per Ton of raw biomass.

The percentage of xylose consumed by the yeast was calculated to be around 41%. This is a low figure, as it seems that the CelluX 4™ yeast was not able to efficiently consume the xylose released by saccharification in the assay.

After performing the test with bioextruded SCC on laboratory scale, it was confirmed that the bioextrudate was well buffered by the pretreatment and additional buffering in the reactor wasn't necessary to stabilize the PH. Starting from this assessment, another experiment was done, using the same pretreated SCC also aiming at 20% pretreated biomass (w/w), Cellic® Ctec2 at 15FPU/g dry matter of extrudate. This time, the bioextruded SCC was diluted to 20% using only sterile water instead of citrate-phosphate buffer.

As with the last experiment, due to the fluctuating nature of the pretreatment, and aiming for 20% pretreated biomass (w/w), we ended up with a final concentration of 19.5% of dry matter.

The results were surprising and are presented below:

Fig 4.

A sugar peak was observed early on as they yeast are in growth phase, decreasing rapidly afterwards as the yeast switch into fermentative metabolism, at which point sugars were consumed faster than they were produced by saccharification

The test ran well: glucose was consumed at the expected rate, but this time a full consumption of xylose was observed. The final ethanol concentration was slightly higher than previous experiments with a final concentration of 35g/l.

Using the same result presented in Fig 3. for hydrolysis yield, it can be calculated that a maximum yield of 37g/l of ethanol from the sugars released during saccharification was possible. With a final concentration of 35.5g/L, it means that the ethanol yield (g EtOH/g consumed sugars) was close to 90% of the maximum theoretical yield (0.45g/g out of 0.51g/g), as seen in the previous experiment.

The difference between these two experiments was the percentage of xylose consumed, with a residual concentration of less than 2g/l in the latter experiment. This percentage is around 88% for this experiment, more than twice than in the former experiment.

Altogether, the total production of ethanol was around 190 liters of ethanol produced per Ton of raw biomass, which was an improvement of almost 20% from previous experiments.

Using the same raw biomass and without changing the parameters of the pretreatment, it was possible to improve the performance of almost 20% just by switching between citrate buffering and water.

This difference in behavior can be explained by the presence of a compound that inhibited yeast metabolism. Since the consumption of glucose and the ethanol yield of consumed sugars did not seem to be affected, the detrimental impact is only seen with regards to the consumption of xylose.

According to Casey E and al. (2013), the effects of salts on recombinant *saccharomyces cerevisiae* capable of consuming xylose, is mostly seen on the consumption of xylose rather than glucose.

The switch from using a citrate-phosphate buffer to only using water, effectively removed almost 0.35 Molar of salts (mainly sodium and phosphate), helping us gain almost 20% in terms of performances.

Table 2.

As explained earlier, our pretreatment is done by adding a fair amount of NaOH into the extruder and then neutralizing it with H₂SO₄. Even with a filtration step, high levels of salts in the bio-extrudate are possible at the end of the pretreatment step.

Our hypothesis is that these quantities of salts could be detrimental for the simultaneous saccharification and fermentation reaction.

To test this hypothesis, an experiment was done using a higher percentage of dry biomass in the reactor. As seen earlier, the CelluX 4™ yeast seems to easily accommodate 19-20% dry matter. In order to target better performances, tests at different concentrations of dry matter were performed.

To ensure that the observed effect was only due to the quantities of extrudate SCC, we performed hydrolysis at 20%, 25% and 30% dry matter (Data not shown). Our results do not show any effects of the concentration of dry matter on final hydrolysis yields at 96h, neither for glucose nor for xylose.

Using the same bioextrudate as the first experiment, and to rule out an impact of different hydrolysis kinetics, three different 24h pre-hydrolysis reactions followed by fermentation were done in laboratory, at 20% dry matter, 25% and 29% with Cellic® Ctec2 at 15FPU/g. Bioextruded SCC was subjected to 24h pre-hydrolysis before inoculation by CelluX 4™.

Fig 5.

Fig 6.

Looking closely at the production of ethanol (Fig 5.), and not considering the final concentration, it can be noted that the speed of production of ethanol was inversely proportional to the percentage of dry matter in the wort. Despite this, the final concentrations are all similar, even though the highest concentration was found using 25% of dry matter with 41g/l of ethanol.

The consumption of glucose occurred quickly in every experiment and glucose was totally consumed within 24h (30h for 29%). If looking closely at the consumption of xylose, it should be noted that xylose was almost totally consumed when 20% dry matter was used, as seen earlier. For 25% dry matter, the speed of consumption was slower and not all the xylose was consumed at the end., It seems that the yeast would have consumed all the xylose if reaction time was longer. At 29% dry matter, however, the consumption of xylose was weak and stopped mid-reaction, as xylose started accumulating after 70h.

Based on the hydrolysis yield from the previous saccharification (Fig 3.), the percentage of xylose consumed by CelluX 4™ can be evaluated. As seen earlier, at 20% dry matter, the yeast consumes almost all the xylose (94%). This percentage

drops dramatically in correlation with the percentage of dry matter, going down to 84% at 25% SCC and as low as 25% for 29% SCC.

Table 3.

Finally, we measured the concentration of the two types of salt that are added by the pretreatment, namely sulfate and sodium salts.

The results show that the ratio between these two salts is 4-to-1 in favor of sodium. The measured concentrations were approximately 0.04 Molar of sulfate and 0.16 Molar of sodium at 20% dry matter, 0.05 Molar of sulfate and 0.2 Molar of sodium at 25% dry matter and 0.06 Molar of sulfate and 0.23 Molar of sodium at 30% dry matter. The concentrations of these salts are proportional to the quantity of biomass at 20% -25% - 30% DM, confirming that salts come from the pretreatment. It is also in the range that Casey et al., 2013 used in their study.

Looking at these results as well as literature, our hypothesis is that the addition of salts, here in the form of sodium and phosphate from citrate-Phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), is responsible for a major drop in performances during the simultaneous saccharification and fermentation of bioextruded Sweet Corn Cob at 20%. Indeed, the addition of less than 35mMolar of salts mainly affects the consumption of xylose, in terms of speed but also in terms of total consumption. More specifically, the consumed xylose drops from 88% to 41% with addition of salts.

Following these assessments, we tried to add more biomass in order to target higher performances and understand the mechanisms leading to the consumption of xylose by the CelluX 4™ yeast strain.

What we observe was that the consumption of xylose, its speed, but also the consumed percentage was inversely proportional to the quantities of pretreated lignocellulosic biomass in the reactor.

Our hypothesis is that even with the filtration step of the pretreatment, a fair amount of salts was present in the bioextrudate. At 20% dry matter, the concentrations of these salts do not seem to be detrimental for the yeast, but as we go higher in terms of dry matter, we were able to observe a substantial decrease in xylose consumption. We measured the concentration of these salts and found that the pretreatment adds around 0.01 Molar per % dry matter. Aiming at between 20% to 30% dry matter, this means that 0.2 Molar to 0.3 Molar of salts were added, mainly sodium. As demonstrated by Casey et al., 2013 and this work, it is sufficient to reduce the specific xylose consumption by more than 40%.

The consumption of glucose, and hence the total ethanol yield (consumed sugars), is also affected, albeit in a lesser way. We cannot rule out the effect of viscosity, osmotic stress or the presence of other inhibitors in the biomass, but we think that the

presence of salts from pretreatment is playing a significant role in the tendencies observed in these experiments.

To investigate the impact of salts compared to other stresses (viscosity or osmotic), we were able to wash the extruded SCC to get rid of the majority of the salts. Experiments now need to be run in order to evaluate the performances on this 'washed' substrate.

This is still preliminary work, as we also need to evaluate the impact of different salts on the xylose metabolism of the CelluX 4™ yeast. We designed experiments in order to test the role of different salts on the CelluX 4™ metabolism using mineral media in order to avoid the effects of viscosity caused by complex media.

4. CONCLUSION

In this study we demonstrated the impact of the presence of salts on xylose consumption and the overall performance of genetically modified CelluX 4™ Yeast. Combined with other inhibitory factors, this effect is magnified by the higher concentrations of biomass required in order to render second generation bioethanol economically viable.

We demonstrated that there is room for improvement, however, we also managed to obtain a production of almost 190 Liter of ethanol per ton of raw sweet corn cob. We showed that our combined process of twin screw bioextrusion and SSCF can and will be a viable option for the industrial conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol by reducing the number of bioreactor and process steps.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by the European Community (Horizon 2020) under Grant agreement reference n°654365 (BABET-REAL 5 PROJECT).

6. REFERENCES

Adeboye, P. T., Bettiga, M., & Olsson, L. (2014). The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological

- responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express*, 4(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0046-7>
- Aldiguier, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E., & Molina-Jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(4), 217–222. <https://doi.org/10.1007/s00449-004-0352-6>
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(4), 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Alvira, P., Negro, M. J., Ballesteros, I., González, A., & Ballesteros, M. (2016). Steam Explosion for Wheat Straw Pretreatment for Sugars Production. *Bioethanol*, 2(1), 66–75. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0003>
- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 95–120. <https://doi.org/10.1128/mubr.00042-09>
- Aslankoochi, E., Rezaei, M. N., Vervoort, Y., Courtin, C., & Verstrepen, K. (2015). Glycerol Production by Fermenting Yeast Cells Is Essential for Optimal Bread Dough Fermentation. *PLoS ONE*, 10, e0119364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119364>
- Avcı, A., Saha, B. C., Kennedy, G. J., & Cotta, M. A. (2013). Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Bioresource Technology*, 142, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.002>
- Baker, A. A., Helbert, W., Sugiyama, J., & Miles, M. J. (2000). New insight into cellulose structure by atomic force microscopy shows the I(α) crystal phase at near-atomic resolution. *Biophysical Journal*, 79(2), 1139–1145. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76367-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76367-3)
- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6(DEC), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., & Garrido-Fernandez, A. (2008). Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.7.1412>
- 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(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0507-6>
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-

- binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bouvier, J. M., & Campanella, O. H. (2014). Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials. *Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials*, 9781444338(1983), 1–518. <https://doi.org/10.1002/9781118541685>
- Brat, D., Boles, E., & Wiedemann, B. (2009). Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2304–2311. <https://doi.org/10.1128/AEM.02522-08>
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
- CARPITA, N., SABULARSE, D., MONTEZINOS, D., & DELMER, D. P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science*, 205(4411), 1144 LP – 1147. <https://doi.org/10.1126/science.205.4411.1144>
- 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(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-83>
- Casey, G. P., & Ingledew, W. M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(3), 219–280. <https://doi.org/10.3109/10408418609108739>
- Cassells, B., Karhumaa, K., Sánchez I Nogué, V., & Lidén, G. (2017). Hybrid SSF/SHF Processing of SO₂ Pretreated Wheat Straw-Tuning Co-fermentation by Yeast Inoculum Size and Hydrolysis Time. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(2), 536–547. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2229-y>
- 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. In *Bioresource Technology* (Vol. 264, pp. 370–381). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Romani, A., Thevelein, J. M., & Domingues, L. (2019). Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>
- da Costa Nogueira, C., de Araújo Padilha, C. E., de Jesus, A. A., de Santana Souza, D. F., de Assis, C. F., de Sousa Junior, F. C., & dos Santos, E. S. (n.d.). Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and

- fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. In *Industrial crops and products: Vol. v. 130*. Elsevier B.V.
- Davidson, T. C., Newman, R. H., & Ryan, M. J. (2004). Variations in the fibre repeat between samples of cellulose I from different sources. *Carbohydrate Research*, 339(18), 2889–2893. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.005>
- de Souza, W. R. (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. <https://doi.org/10.5772/54325>
- de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 65(4), 497–522, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>
- Del Carmen Fong Lopez, M., Rigal, M., Rigal, L., Vilarem, G., & Vandebossche, V. (2019). Influence of temperature and soda concentration in a thermo-mechano-chemical pretreatment for bioethanol production from sweet corn co-products. *Industrial Crops and Products*, 133, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.044>
- Digman, M. F., Shinnars, K. J., Casler, M. D., Dien, B. S., Hatfield, R. D., Jung, H. J. G., Muck, R. E., & Weimer, P. J. (2010). Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(14), 5305–5314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.014>
- Ding, M.-Z., Wang, X., Yang, Y., & Yuan, Y.-J. (2011). Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. *OmicS: A Journal of Integrative Biology*, 15(10), 647–653. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0003>
- 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*, 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. (2014a). 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., González, A., & Ballesteros, M. (2014b). 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>
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C. (2013). Yeast: World's Finest Chef. *Food Industry, May 2014*. <https://doi.org/10.5772/53156>
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>

- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(5), 1298–1315. <https://doi.org/10.1002/bit.22256>
- 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 BT - Green Fuels Technology: Biofuels* (C. R. Soccol, S. K. Brar, C. Faulds, & L. P. Ramos (eds.)); pp. 147–173). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_7
- Fong, M. (2019). *Développement d'un procédé de dégradation enzymatique de la biomasse lignocellulosique mettant en œuvre des moyens thermo-mécano-chimiques. Umr 5215.*
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(12), 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- Gatt, E., Khatri, V., Bley, J., Barnabé, S., Vandenbossche, V., & Beauregard, M. (2019). Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: New insights into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules. *Bioresource Technology*, *282*, 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.045>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, *59*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gibson, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface*, *9*(76), 2749–2766. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0341>
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Łukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Han, M., Kim, Y., Cho, W. S., Choi, G. W., & Chung, B. W. (2016). An integrated process for continuous cellulosic bioethanol production. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *33*(1), 223–229. <https://doi.org/10.1007/s11814-015-0121-z>
- Hara, K. Y., Kobayashi, J., Yamada, R., Sasaki, D., Kuriya, Y., Hirono-Hara, Y., Ishii, J., Araki, M., & Kondo, A. (2017). Transporter engineering in biomass utilization by yeast. *FEMS Yeast Research*, *17*(7). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox061>
- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: Current state, challenges, and opportunities. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 9, Issue 18, p. 3721). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app9183721>

- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, *315*(5813), 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- 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*(18), 8940–8948. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.015>
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *66*(2), 300–372. <https://doi.org/10.1128/membr.66.2.300-372.2002>
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *583*(24), 4025–4029. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>
- Jin, M., & Dale, B. E. (2018). *AFEX™ Pretreatment-Based Biorefinery Technologies BT - Handbook of Biorefinery Research and Technology* (J. M. Park (ed.); pp. 1–16). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6724-9_2-1
- Jönsson, L. J., Aliksson, B., & Nilvebrant, N. O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- 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>
- Karhumaa, K., Garcia Sanchez, R., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2007). Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *6*, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-5>
- Karunanithy, C., & Muthukumarappan, K. (2010). Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*(1), 264–279. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8757-y>
- Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *199*, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, *44*(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kumagai, A., Kawamura, S., Lee, S.-H., Endo, T., Rodriguez, M. J., & Mielenz, J. R. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing for Hinoki cypress and Eucalyptus after fibrillation by steam and subsequent wet-disk milling. *Bioresource Technology*, *162*, 89–95.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.110>
- Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Op den Camp, H. J. M., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research*, 4(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00141-7)
- Kuyper, M., Hartog, M. M. P., Toirkens, M. J., Almering, M. J. H., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2005). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.010>
- Lee, S.-M., Jellison, T., & Alper, H. S. (2012). Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5708–5716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01419-12>
- 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(February), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.088>
- Liu, Z.-H., Qin, L., Zhu, J.-Q., Li, B.-Z., & Yuan, Y.-J. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0167-x>
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. F. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 539–550. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x>
- Maiorella, B. L., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1984). Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(10), 1155–1166. <https://doi.org/10.1002/bit.260261004>
- Marriott, P. E., Gómez, L. D., & Mcqueen-Mason, S. J. (2016). Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytologist*, 209(4), 1366–1381. <https://doi.org/10.1111/nph.13684>
- Modenbach, A., & Nokes, S. (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>
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., Fernández, J. L., & Ballesteros, M. (2013). Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast

- Kluyveromyces-Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.006>
- Moreno, A. D., Tomás-Pejó, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., & Olsson, L. (2013). Fed-batch SSCF using steam-exploded wheat straw at high dry matter consistencies and a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain: Effect of laccase supplementation. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-160>
- Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231–241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00352.x>
- Nixon, B. T., Mansouri, K., Singh, A., Du, J., Davis, J. K., Lee, J. G., Slabaugh, E., Vandavasi, V. G., O'Neill, H., Roberts, E. M., Roberts, A. W., Yingling, Y. G., & Haigler, C. H. (2016). Comparative Structural and Computational Analysis Supports Eighteen Cellulose Synthases in the Plant Cellulose Synthesis Complex. *Scientific Reports*, 6(June), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep28696>
- Offiah, V., Kontogiorgos, V., & Falade, K. O. (2019). Extrusion processing of raw food materials and by-products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(18), 2979–2998. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1480007>
- 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(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Olofsson, K., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2010). Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 17. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-17>
- Olofsson, K., Rudolf, A., & Lidén, G. (2008). Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2008.01.004>
- Olson, D. G., McBride, J. E., Joe Shaw, A., & Lynd, L. R. (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.026>
- Palmqvist, B., & Lidén, G. (2014). Combining the effects of process design and pH for improved xylose conversion in high solid ethanol production from *Arundo donax*. *AMB Express*, 4, 41. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0041-z>
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Parisutham, V., Kim, T. H., & Lee, S. K. (2014). Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production.

- Bioresource Technology*, 161, 431–440.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>
- Patel, M. A., Ou, M. S., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2005). Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1453–1460.
<https://doi.org/10.1021/bp0400339>
- Patiño, M. A., Ortiz, J. P., Velásquez, M., & Stambuk, B. U. (2019). d -Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* : A review. *Yeast*, 36(9), yea.3429. <https://doi.org/10.1002/yea.3429>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Peña, A., Sánchez, N. S., Álvarez, H., Calahorra, M., & Ramírez, J. (2015). Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fou005>
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C. A., Hallett, J. P., & Liotta, C. L. (2006). From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production. *Industrial Biotechnology*, 2(1), 55–65. <https://doi.org/10.1089/ind.2006.2.55>
- 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-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3(1–2), 29–60.
<https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>
- Romaní, A., Garrote, G., & Parajó, J. C. (2012). Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading. *Fuel*, 94, 305–312.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.013>
- Sakimoto Kouki A4 - Kanna, Machi A4 - Matsumura, Yukihiko, K. A.-S. (2017). Kinetic model of cellulose degradation using simultaneous saccharification and fermentation. *Biomass and Bioenergy*, v. 99, 116-121–2017 v.99.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.02.016>
- Schuster, B. G., & Chinn, M. S. (2013). Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Feedstocks for Ethanol Fuel Production. *BioEnergy Research*, 6(2), 416–435. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9278-z>
- Seike, T., Kobayashi, Y., Sahara, T., Ohgiya, S., Kamagata, Y., & Fujimori, K. E. (2019). Molecular evolutionary engineering of xylose isomerase to improve its catalytic activity and performance of micro-aerobic glucose/xylose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1474-z>
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 985685. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>

- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., & Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.006>
- Siriwong, T., Laimeheriwa, B., Aini, U. N., Cahyanto, M. N., Reungsang, A., & Salakkam, A. (2019). Cold hydrolysis of cassava pulp and its use in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process for ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, 292, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.003>
- Söderström, J., Galbe, M., & Zacchi, G. (2005). Separate versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Two-Step Steam Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 25(3), 187–202. <https://doi.org/10.1080/02773810500191807>
- Sonnleitner, B., & Käppeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(6), 927–937. <https://doi.org/10.1002/bit.260280620>
- Sreenath, H. K., & Jeffries, T. W. (2000). Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technology*, 72(3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00113-3)
- Stenberg, K. (1999). *Ethanol from softwood: Process development based on steam pretreatment and SSF*. [http://portal.research.lu.se/portal/en/publications/ethanol-from-softwood--process-development-based-on-steam-pretreatment-and-ssf\(5e5b442e-4ef2-46a6-bc17-bd39d2fd4f11\).html](http://portal.research.lu.se/portal/en/publications/ethanol-from-softwood--process-development-based-on-steam-pretreatment-and-ssf(5e5b442e-4ef2-46a6-bc17-bd39d2fd4f11).html)
- Sun, S., & Heitman, J. (2011). Is sex necessary? In *BMC biology* (Vol. 9, p. 56). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-56>
- Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Siika-aho, M., Niku-Paavola, M.-L., Viikari, L., & Buchert, J. (2000). Trichoderma reesei cellulases and their core domain in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose*, 7, 189–209. <https://doi.org/10.1023/A:1009280109519>
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s002530000328>
- Tavva, S. S. M. D., Deshpande, A., Durbha, S. R., Palakollu, V. A. R., Goparaju, A. U., Yechuri, V. R., Bandaru, V. R., & Muktinutalapati, V. S. R. (2016). Bioethanol production through separate hydrolysis and fermentation of *Parthenium hysterophorus* biomass. *Renewable Energy*, 86, 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.074>
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2011). *Chapter 7@_ Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion*.
- Tomás-Pejó, E., Ballesteros, • M, Oliva, • J M, & Olsson, • L. (2010). *Adaptation of the xylose fermenting yeast Saccharomyces cerevisiae F12 for improving*

- ethanol production in different fed-batch SSF processes.* <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0768-8>
- Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A. (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, *242*, 125080. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125080>
- Van Soest, P. J., & 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.
- 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., Doumeng, C., & Rigal, L. (2014). Thermomechanical and Thermo-mechano-chemical Pretreatment of Wheat Straw using a Twin-screw Extruder. *BioResources*, *9*(1), 1519–1538. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.1519-1538>
- Verduyn, C., Zomerdijk, T. P. L., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *19*(3), 181–185. <https://doi.org/10.1007/BF00256451>
- Weiss, N. D., Felby, C., & Thygesen, L. G. (2019). Enzymatic hydrolysis is limited by biomass-water interactions at high-solids: Improved performance through substrate modifications 09 Engineering 0904 Chemical Engineering 09 Engineering 0915 Interdisciplinary Engineering. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1339-x>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017a). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 71, pp. 475–501). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017b). 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>
- Zacchi, G., & Axelsson, A. (1989). Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, *34*(2), 223–233. <https://doi.org/10.1002/bit.260340211>
- Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*(1–2), 17–34. <https://doi.org/10.1007/s002530100624>
- Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V., & Wang, D. (2016). Optimization of Bioethanol Production Using Whole Plant of Water Hyacinth as Substrate in

- Simultaneous Saccharification and Fermentation Process. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01411>
- Zhang, Y., Dubé, M. A., McLean, D. D., & Kates, M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, 89(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00040-3)
- Zhang, Y. H. P., Ding, S. Y., Mielenz, J. R., Cui, J. B., Elander, R. T., Laser, M., Himmel, M. E., McMillan, J. R., & Lynd, L. R. (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2), 214–223. <https://doi.org/10.1002/bit.21386>
- Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Zheng, J., & Rehmann, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18967–18984. <https://doi.org/10.3390/ijms151018967>

7. FIGURE CAPTIONS

- Figure 95. Schematic representation of twin-screw extruder EV25, formed by 10 thermoregulated modules. The temperature set point is indicated for each module. NC: Non-Controlled; TP: Temperature Probe
- Figure 96. Hydrolysis yields for glucose and xylose of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g.
- Figure 97. Kinetics of the consumption of glucose, xylose and the production of ethanol during the simultaneous saccharification and cofermentation of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g with citrate buffer.
- Figure 98. Kinetics of the consumption of glucose, xylose and the production of ethanol during the simultaneous saccharification and cofermentation of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g without buffering.
- Figure 99. Kinetics of the consumption of glucose, xylose and the production of ethanol during the co-fermentation of bioextruded SCC using Cellic® Ctec2 at 15FPU/g without buffering. **A.** SCC at 20% **B.** SCC at 25% **C.** SCC at 29%
- Figure 100. Evolution of the residual concentration of Ethanol (A) and xylose (B) during fermentation of bioextruded SCC at 20%, 25% and 29%

8. TABLES AND FIGURES

Fig 1.

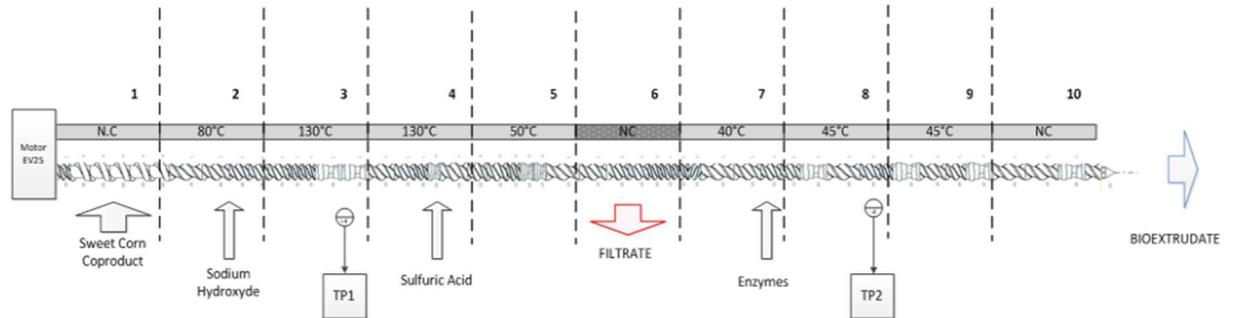


Fig 2.

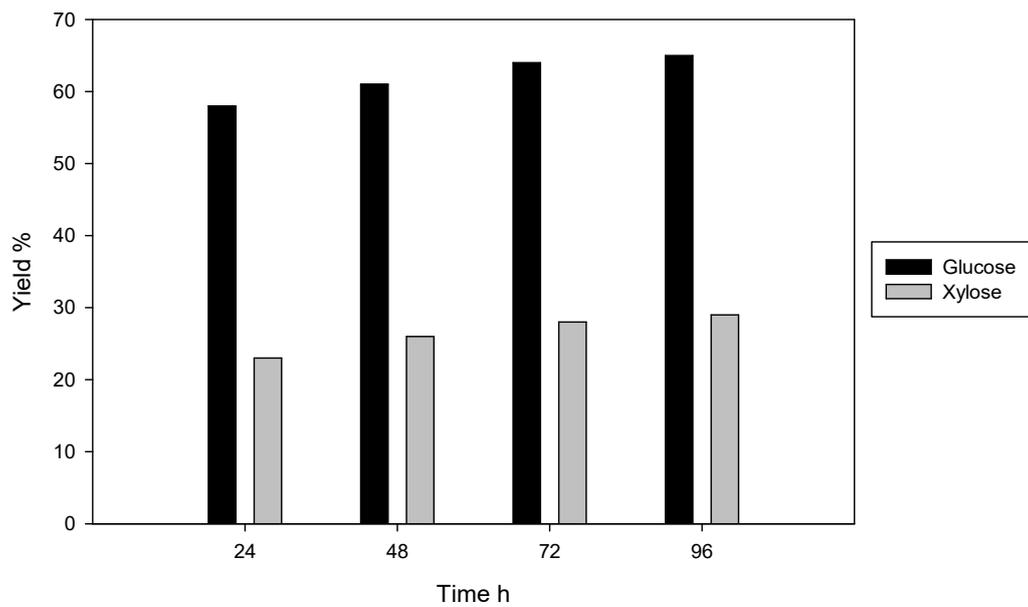


Fig 3.

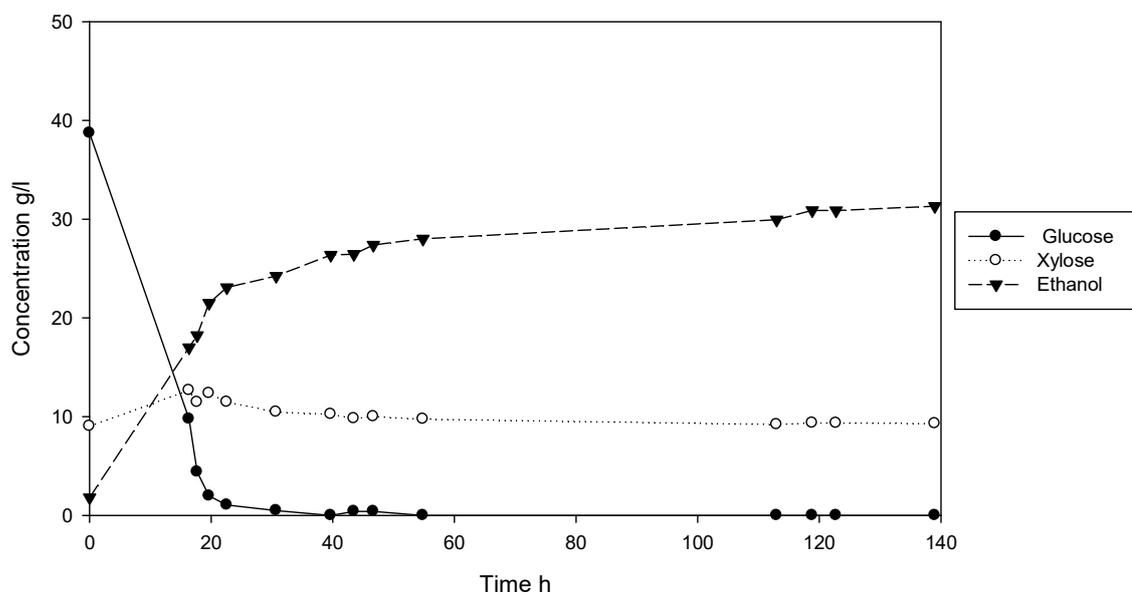


Fig 4.

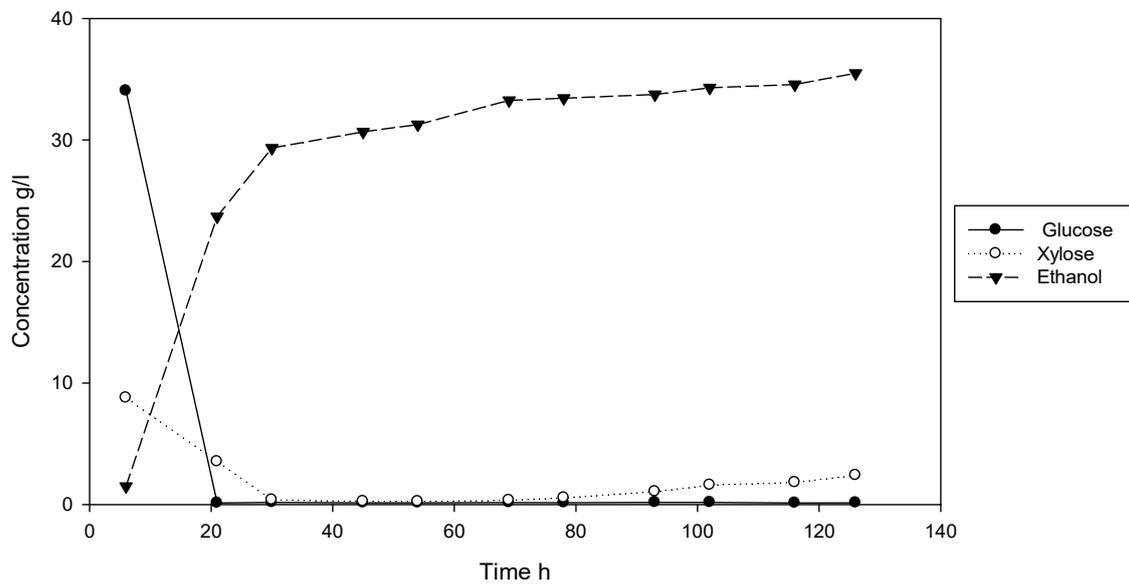


Fig 5. A.

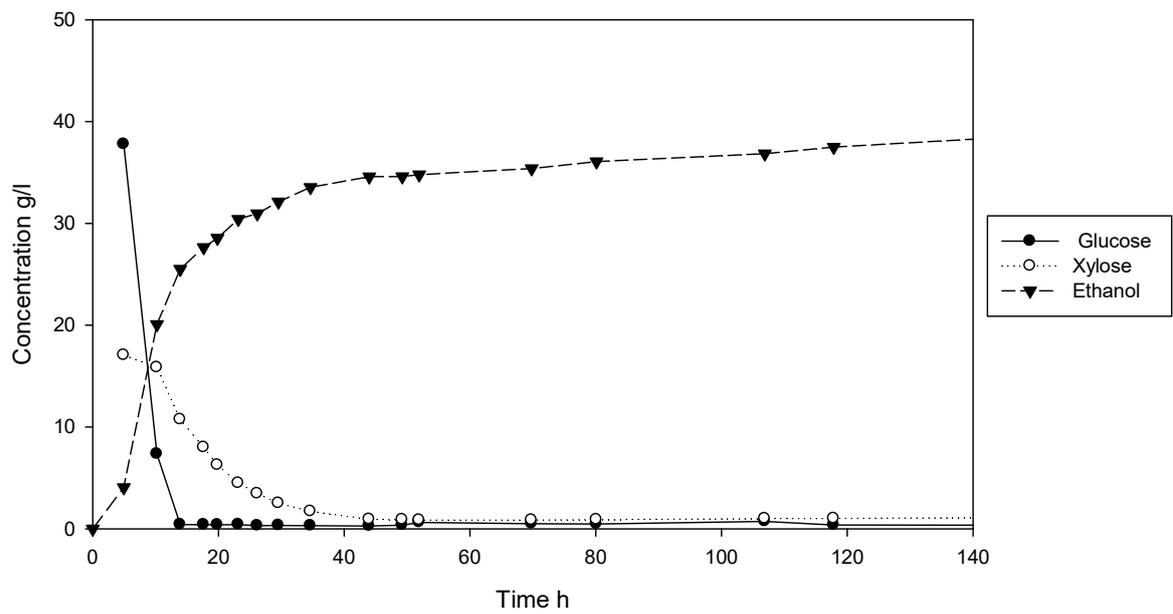


Fig 5. B

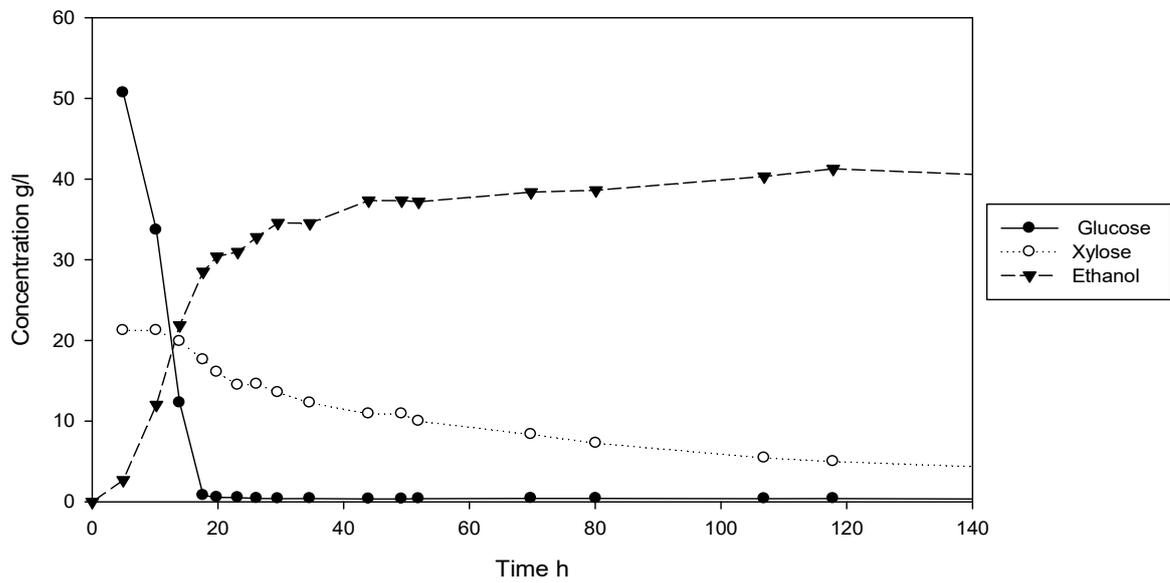


Fig 5. C

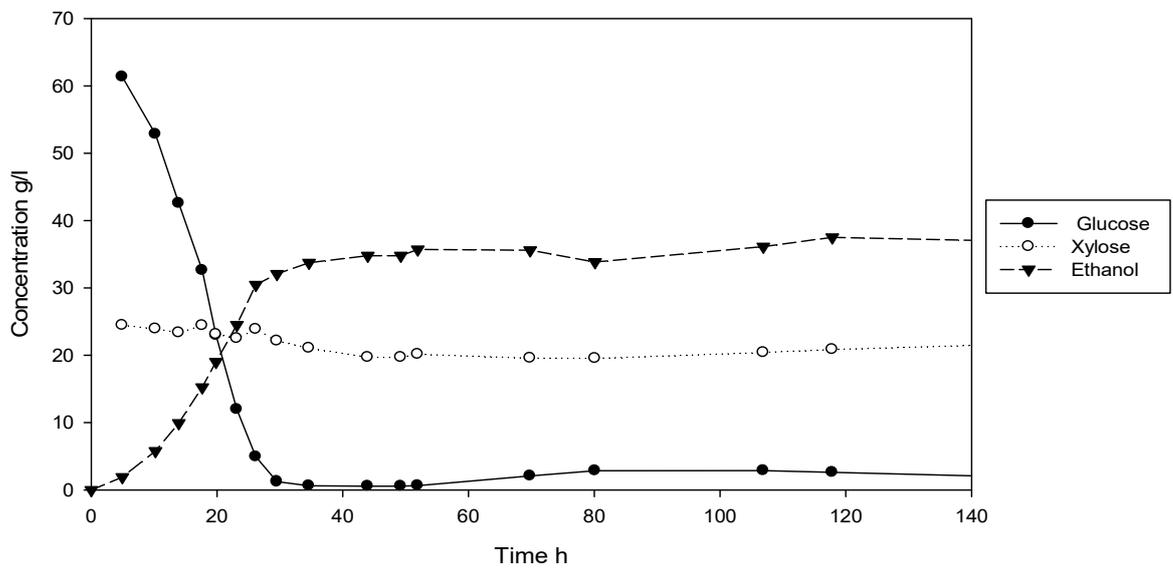


Fig 6. A

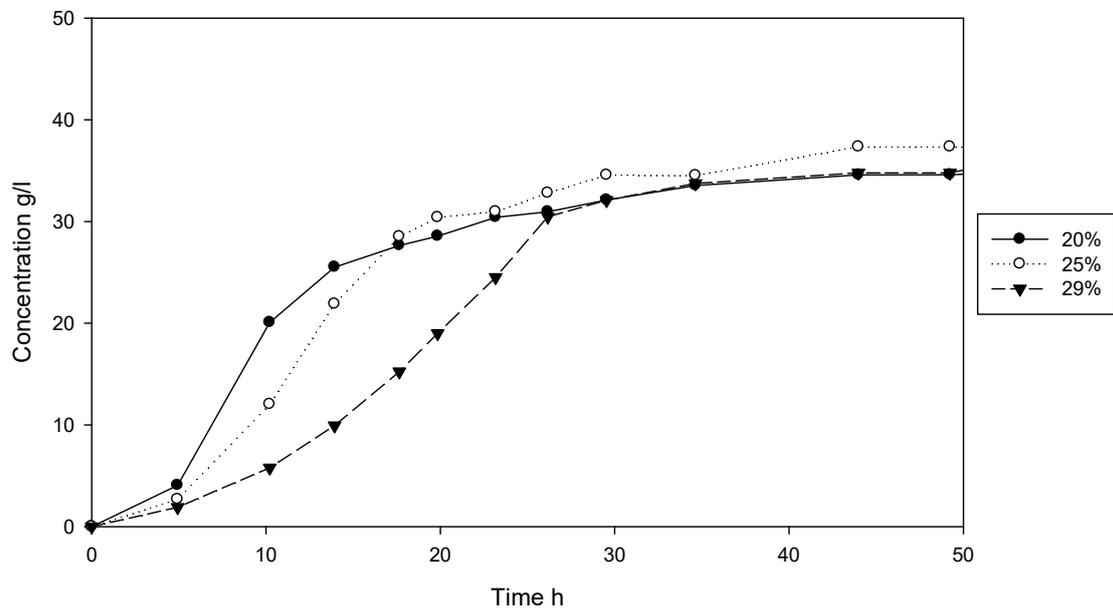


Fig 6. B

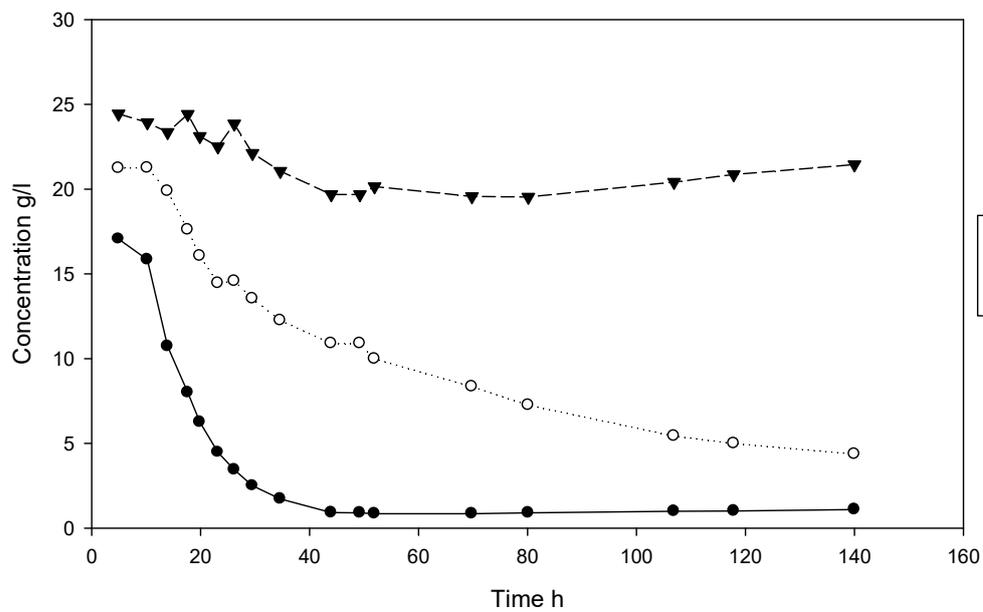


Table 1. Composition analysis of the raw sweet corn coproduct, extrudate and bioextrudate, the analysis was carried out with 2 techniques: the ADF-NDF-KMNO₃ method and total sugar analysis

Composition	Units	Raw sweet corn					
		coproduct		Extrudate		Bioextrudate	
		Values	S.D.	Values	S.D.	Values	S.D.
<i>Dry matter</i>	%	89.5	± 0.1	33.7	± 0.1	27.7	± 0.2
<i>Minerals</i>	%/DM	5.9	± 0.3	8.4	± 0.1	8.4	± 0.1
<i>ADF-NDF-KMNO₃ analysis</i>							
<i>Insoluble fiber</i>	%/DM	75.2	± 0.5	73.5	± 0.3	43.8	± 0.1
<i>Cellulose</i>	%/IF (%/DM)	40.8 (31.0)	± 2.2	48.43 (35.6)	± 1,3	56.4 (24.7)	± 0.5
<i>Hemicelluloses</i>	%/IF (%/DM)	53.1 (39.0)	± 2.1	46,5 (34.2)	± 4.3	34 (15)	± 1.5
<i>Lignin</i>	%/IF (%/DM)	6.1 (5.0)	± 3.8	5 (3.7)	± 2.2	9.4 (4.1)	± 0.7
<i>Total sugar analysis</i>							
<i>Glucose</i>	mg/g of dry SCC	220	± 23	220	± 10	N.D.	
<i>Xylose</i>	mg/g of dry SCC	260	± 7	300	± 10	N.D.	
<i>Arabinose</i>	mg/g of dry SCC	50	± 2	50	± 5	N.D.	
<i>Galactose</i>	mg/g of dry SCC	20	± 5	10	± 7	N.D.	
ADF-NDF-KMNO ₃ ; DM: Dry Matter; IF: Insoluble Fiber; SCC: Sweet Corn Coproduct							

Table 2. Results of SSCF experiments using SCC diluted in buffer or distilled water

	SCC buffered	SCC non-buffered
Final [Ethanol] g/l	32	35
Litre ethanol/Ton inlet biomass	160	188
Yield EtOH Consumed sugar g/g	0.45	0.45
Yield EtOH g/g	0.40	0.44
Percentage xylose consumed	41%	88%

Table 3. Results of the experiment with various concentrations of SCC in the reactor (20%, 25% and 29% DM respectively)

*EtOH yield from consumed sugars are calculated by subtracting from the potential sugars liberated by hydrolysis, the residual sugars (xylose + glucose) present at the end of the fermentation.

SCC bioextruded	20%	25%	29%
Final [Ethanol] g/l	38	41	37
Litre ethanol/Ton inlet biomass	186	154	121
Yield EtOH g/g Consumed sugar *	0.47	0.39	0.37
Yield EtOH g/g	0.46	0.38	0.30
Percentage xylose consumed	94%	84%	29%

QUANTIFICATION OF YEASTS IN LIGNOCELLULOSIC FERMENTATION PROCESSES BY QRT PCR METHOD.

J. Lesage (*), L. Le Corfec (*), A. Fougerouse, X. Cameleyre, S. Alfenore (**)
TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, Toulouse, France

(*) These two authors worked equally on this project

(**) Corresponding author: Sandrine Alfenore alfenore@insa-toulouse.fr

TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31400
Toulouse, France

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is used in lignocellulosic fermentation process but no classical method permits to quantify its growth in such complex medium. We develop a method to quantify yeast concentration during fermentation process containing fiber by quantitative PCR technique. Concentrations between 10^3 to 10^9 cell/mL can be measured.

Keywords : qPCR, yeast, lignocellulosic biomass, fermentation, quantification

Introduction

Nowadays, the important consumer demand in terms of energy and chemicals, the increasing concern about climate change and the gradual disappearance of fossil fuel reserves lead to develop new sustainable routes (Mohd Azhar et al., 2017; Zabed et al., 2017). For several years, production of chemicals from renewable sources have emerged. In the wake of first-generation fuels, derived from plant dedicated to human and/or animal food chains, those derived from lignocellulosic sources appear to be more and more attractive. The use of lignocellulosic materials requires tackling challenges related to the deconstruction of the complex plant matrix to release on one hand lignin and on the other hand cellulose and hemicellulose to be transformed by fermentation process for example (Liu et al., 2020). In lignocellulose bio-conversion processes, different steps are required: raw material pre-treatment, hydrolysis step (either enzymatic or chemical) before or simultaneously with the fermentation phase. Hydrolysis allow releasing sugar monomers especially glucose and xylose. These monomers can be metabolized by yeasts or bacteria to produce the targeted molecule

(Candido et al., 2019; Fujii et al., 2014). In this scheme, both pre-treatment and hydrolysis lead to deconstruct the plant wall to release fermentable sugars, but the obtained hydrolysates have different composition in terms of sugar monomers but also in terms of residual fibres, insoluble, lignin content etc... depending on the adopted strategies (Malik et al., 2020).

For fermentation step, due to the heterogeneity of the medium, its opacity and presence of microbial contaminants, cellular growth cannot be quantified easily and neither methods such as numeration by microscopy, optical density and flow cytometry nor cell dry weight cannot be used in such complex medium. However, to optimize the performances of the fermentation process, it is crucial to quantify precisely the microbial reaction either in terms of kinetics or carbon metabolism i.e. the part of the cellular biomass synthesis (i.e. anabolism) in comparison with metabolite production (i.e. catabolism).

PCR quantification technique is based on DNA amplification using specific nucleotide targets. In microbiology, several real-time PCR methods have been developed to detect and quantify bacteria and yeasts in different complex matrix like food (Malorny et al., 2004), soil (Huang et al., 2009) or rumen of cow (Sylvester et al., 2004) to identify or quantify either genus or specific microbial species. Different qPCR methods were used to identify and to quantify ratios between yeast species and contaminants in wine fermentation (Hierro et al., 2007; Martorell et al., 2005; Salinas et al., 2009; Wang et al., 2020). In a lignocellulosic biomass, Simeng et al (2015) used PCR-based method to quantify fungal biomass during solid state fermentation.

In this study, we develop a specific, sensitive and efficient method using real time PCR in order to be able to quantify *Saccharomyces cerevisiae* growth during fermentation process using complex lignocellulosic matrix.

Material and Methods

2.1. Yeast strain

Saccharomyces cerevisiae is one of the most common yeast used in fermentation process. The strain used in our work is an industrial genetically modified yeast, *Saccharomyces cerevisiae* CelluX4™ was kindly provided by Lesaffre (www.lesaffreadvancedfermentations.com). CelluX4™ is a GMO strain of *Saccharomyces cerevisiae* that has been developed for the cellulosic ethanol industry.

2.2 Culture conditions and media.

For DNA calibration curve, the strain was isolated on plate with YPD media agar (yeast extract (10g/L), bactopectone (20g/L) and xylose (20g/L)). One colony was inoculated in a baffled Erlenmeyer flask containing rich medium. Flask cultures were shaken at 130 rpm with a rotary shaker for 16h at 30°C. Before DNA extraction, cells' quantification was made by both absorbance measurements at 620 nm in a 2 mm cuvette and flow cytometry (BD Accuri C6).

For cultures in 5 L bioreactor, the inoculum is prepared in 3 phases. A first culture was inoculated in 30 mL of YPX rich medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% xylose) in 250 mL baffled Erlenmeyer flask. The culture was incubated at 30°C during 24h in rotatory incubator at 130 rpm. Then, the first Erlenmeyer was used to inoculate at a 2 L baffled flask containing 270 mL of mineral medium (KH₂PO₄ 3g/L; (NH₄)₂SO₄ 3 g/L;

Na₂HPO₄,12H₂O 3g/L; MgSO₄,7H₂O 0.5 g/L; Sodium L-glutamate monohydrate 1.1 g/L; ZnSO₄,7H₂O 4 mg/L; CaCl₂,2H₂O 2.3 mg/L; (NH₄)₂FeSO₄,6H₂O 2.3 mg/L; CuSO₄,5H₂O

0.9 mg/L; Na₂MoO₄,2H₂O 0.6 mg/L; CoCl₂,6H₂O 0.5 mg/L; MnSO₄,H₂O 0.38 mg/L; H₃BO₃ 0.3 mg/L) and 20 g/L of xylose. This culture was incubated at 30°C during 12 h at 130 rpm.

2.3. Hydrolysate fermentation

2.3.1 Lab scale reactor

Separate hydrolysis and fermentation were performed in 5 L bioreactors (Sartorius Biostat B). Agitation was ensured by two sets of marine propeller blades. The reactor was equipped with pH and temperature internal probes and the temperature was regulated by a PID. Agitation was kept at around 200 rpm and fermentation was carried out for around 7 days under non-limited aeration conditions. After 48h of hydrolysis at 50°C, the temperature was lowered at 30°C and bioreactor was inoculated with 10% of the total volume.

2.3.2 Gaz analysis

Exhausting gases from the fermenters were analyzed using an Advanced Energy's Innova photoacoustic infrared spectroscopy devices. The quantities of O₂, CO₂ and N₂ was thereby determined and recorded over time.

2.3.3 Supernatant analysis

Samples from the bioreactor were centrifuged at 4000 g for 10 min, the supernatant filtered through a 0.45 µm filter and analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Glucose, xylose, ethanol and glycerol analysis were performed

using an Aminex HPX-87H column (Biorad), and dual detection (refractive index detector and UV detector). The flow rate of the mobile phase (H₂SO₄ 5 mM) was 0.5 mL/min and the HPLC column temperature was set at 50°C.

2.4. Primers selection and design

Four different targets were chosen to quantify cells in lignocellulosic culture matrix. The origin, sequence and amplicon sizes generated are shown in Table 1.

Primer Name	Sequence	amplicon sizes	T _m *	Origin	Reference
SC1	Forward : 5'-ATCGAATTTTTGAACGCACATTG -3' Revers : 5'-CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA-3'	175 bp	60°C	Alcoholic fermentation	Hierro et al., 2007
SC2	Forward : 5'-GGACTCTGGACATGCAAGAT -3' Revers : 5'-ATACCCCTTCTTAACACCTGGC-3'	104 bp	62°C	wine	Salinas et al., 2009
SC3	Forward : 5'-CGATTTTCGATGCTACTCACG -3' Revers : 5'-TTATCGCCTGATGGACTGTC-3'	100 bp	56°C	Wine	Alonso-del-Real et al., 2017
SC4	Forward: 5'-GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC- 3' Revers : 5'TCTCTTTCCAAAGTTCTTTTCATCTTT-3'	124 bp	60°C	wine	Hierro et al., 2006

Table 1: Characteristics of the chosen primers; * T_m = Primer melting temperature indicated in the origin publication

To find and validate the best primers for our strain, a gradient PCR has been released on DNA genomic extract of industrial *Saccharomyces cerevisiae*. A stock solution of each primer was prepared at 100 µM in Tris solution and store at -20°C. The working

solution was prepared by diluting the stock solution in milliQ water to obtain a concentration of 10 μM .

The gradient PCR was performed in a 25 μL final volume that contained 12.5 μL of OneTaq HotStart, 2X MasterMix with GC Buffer (NEB), 0.5 μL of each Primer at 10 μM , 1 μL of the DNA template and milliQ nuclease-free water to 25 μL . Bio-Rad C1000 touch thermal cycler was used to perform gradient PCR.

2.5. DNA extraction

The genomic DNA of our cultures is obtained by using the DNeasy® PowerSoil® Kit from QIAGEN.

The first step of the kit procedure (i.e. sample cell lysis) has been optimized regarding both strain and culture conditions (fermentation of hydrolysates). Different cell suspensions were centrifuged at 4000 rpm during 10 minutes and the pellet has been stored at -20°C until analysis or directly used for calibration curve and real-time qPCR.

In 2 mL sterile tube, pellets (i.e. different cell concentrations) have been resuspended in the lysis buffer contained in PowerBead Pro tubes (provided in the commercial kit) and sterile silica micro-beads (0.5mm diameter breach) were added to samples (1:1 w:w).

To evaluate the impact of hydrolysates on DNA extraction, 2 mL cell suspensions (different cell concentrations) were mixed with 2 mL hydrolysate and incubated during 5 min at room temperature. Samples were centrifuged and pellets were put on ice before storage or used. For cells in hydrolysates, micro-beads were added in a 2 mL sterile tube containing these pellets resuspended in lysis buffer as explained before.

All tubes were placed in Fastprep®, vortexed during 20 s at 4 m/s, and put on ice during 5 min. This step was repeated three times. Supernatants were recovered in clean 2 mL collection tubes and then the kit procedure was applied as indicated. At the last step, only 50 μL C6 solution were used to elute DNA.

The DNA was quantify by Nanodrop® and stored at -20°C . The limit of quantification of the Nanodrop® was found at 2 ng/ μL . Based on DNA extract concentration, the equivalent cell concentration was calculated taking that for *S. cerevisiae*, 1 genome weighted 12.3 fg.

2.6. Quantitative PCR assays

PCR amplification was performed in a total reaction volume of 20 μL using

SsoAdvanced™ universal SYBR® Green supermix with primers at 250 nM final concentration, 1 µL of DNA and qsp 20 µ L with nuclease-free water. Reactions were performed in 96-well plates in Stratagene Mx3005P QPCR system (Agilent Technologies) using the following conditions: an initial denaturation step at 98°C for min, followed by 40 cycles of denaturation at 98°C for 15 s and extending at the specific T_m of the probe for 30 s (values in Table 1). After the 40 cycles, a dissociation curve was released to verify the amplicon size. C_t was determined automatically by the instrument. Samples for calibration curves were diluted five times in ten dilution cascade in PBS buffer and analysed in duplicate whereas samples from fermentation were analysed in triplicate. Negative controls (i.e. template and amplifications controls, hydrolysate medium alone) have been analysed.

Results and Discussion

3.1. Validation of primers

The sequences of the primers was provided by papers dealing with the quantification of *Saccharomyces* species in different wine matrix (Alonso-del-Real et al., 2017; Hierro et al., 2007; Salinas et al., 2009). The first step was to make BLAST analyses on NCBI website to verify the possible targets on our strain, similar to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* S288C. All primers have a target on the genome. SC1 and SC4 had multiple target sites on the yeast genome. It would be interesting in order to increase the detection sensitivity and the quantification limits.

To verify the possibility that the primers could also hybridized the lignocellulosic substrate, resulting from the hydrolysis of corn (*Zea mays*), the same BLAST analyses were made on the genome of *Zea mays*. For all primers, possible target site were found but parameters of BLAST confirmed that the probability for the primer to bind the corn genome DNA site was weak. It was verified during all PCR experimentations with each primer (data not shown).

In a second time, a gradient PCR was carried out to determine the optimum melting temperature of each primer and the amplification specificity in our conditions. DNA electrophoreses of the PCR product revealed that the best amplification was obtained with both SC1 and SC3 primers. An optimal melting temperature of 60°C for SC1 was found as for Hierro et al. (2007) but only 53°C for SC3 compared to Alonso-del-Real et al. (2017). For the others primers, the intensity of the DNA amplicon were lower than the two other primers. Moreover, two bands were detected on agarose gel for SC4 primer which indicated unspecific amplification and thus an over-estimated cell quantity. So,

SC1 and SC3 primers were chosen for the quantification of biomass by qPCR.

3.2 Efficiency of DNA extraction

In fermentation process, cell concentration was varying in a range estimated between 10^7 cells/mL up to 10^{10} cells/mL along the cultivation. Using lignocellulosic hydrolysates as substrate, dilutions will not be within the range of cells' concentration required by commercial extraction DNA kits (i.e. 10^8 cells/sample). Then, extraction efficiency had to be evaluated first in a range from 1.10^7 up to 5.10^9 cells/mL. Different extraction conditions were tested: (1) with or without lysis buffer during the "fast prep" step or before the "fast prep" step and (2) the impact of freezing. Different cell concentrations were prepared from the same culture in rich medium. DNA concentrations were obtained by Nanodrop® for each sample. Results were presented in the figure 1.

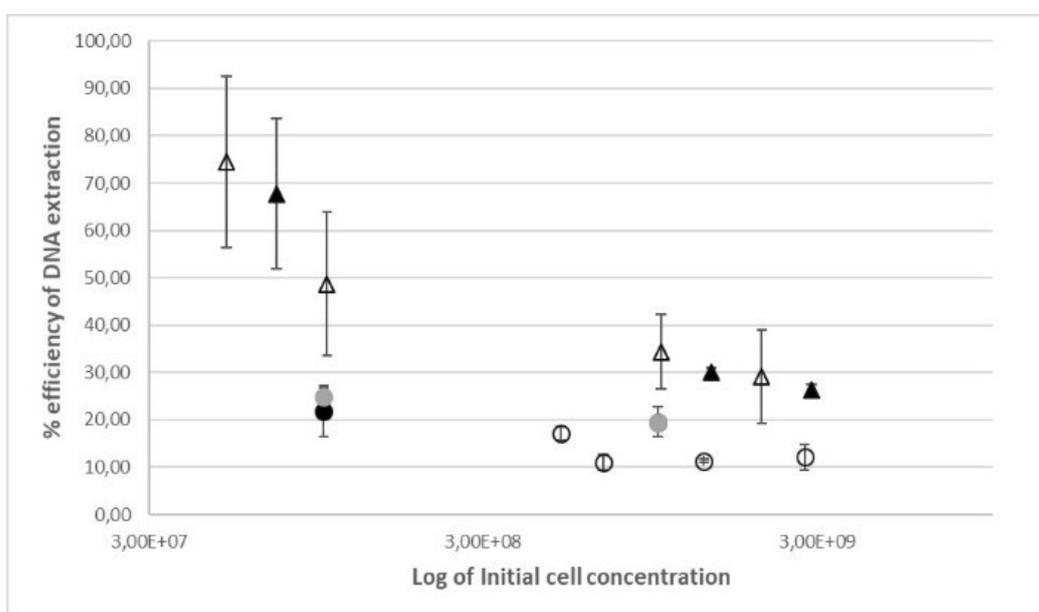


Figure 1: Evaluation of the DNA extraction efficiency in different conditions. DNA extractions on pure cells with C1 buffer after FastPrep (empty circle); cells with C1 buffer before Fastprep (full circle) or with freezing step (gray circle); . DNA extraction on cell in hydrolysate with C1 buffer before Fastprep (full triangle) or with C1 buffer after FastPrep (empty triangle). Error bars were obtained within duplicates.

DNA extractions were made on these samples using lysis buffer before (full circles) or after (empty circles) FastPrep Step with freezing step (gray circles). Cell samples from rich media have been mixed with 1 mL of hydrolysate and DNA extraction has been also evaluated using lysis buffer before (full triangles) or after (empty triangles) FastPrep step. At the end of the extraction, DNA concentration has been measured. Based on the accuracy of the Nanodrop® quantification, all samples containing less than 2 ng/ μ L of DNA were excluded. This led to a minimal initial cell quantity close to $4 \cdot 10^7$ cells. Results in figure 1 showed that extraction efficiency reached around 10 to 15% using lysis buffer before the FastPrep step; a slightly higher extraction efficiency (around 20 to 25 %) was obtained when lysis buffer was used after the Fastprep step. The freezing step had no impact in increasing DNA extraction. Otherwise, the presence of hydrolysates had a significant effect (triangles). DNA extraction in the cell samples containing hydrolysates was twice or three-fold higher than pure samples across the entire tested range. It is probably due to fibers or other insoluble particles that can help extraction by disrupting the cellular matrix. Results showed that the lower the cell concentration, the higher the extraction efficiency. For the weakest quantities of cells, DNA extraction level can reach 75% efficiency. Error bars were found to be very small using duplicates to calculate their values. Due to weak variations in DNA extraction efficiency for cells cultivated in rich medium, calibration curves were established using SC1 and SC3 primers to develop the quantitative method for the quantification of cell concentration.

3.3 Quantification of biomass using q PCR

3.3.1 Calibration curves

Standard calibration curves were established using cells cultivated in YPD medium. Different DNA extractions were carried out on various cellular suspensions (from 10^5 up to 10^9 cell/mL). Ten serial dilutions of these DNA extracts were made to obtain calibration curves between 10^1 to 10^9 cells/mL.

First, primer specificity was evaluated by the dissociation curves that have shown a high specificity for both primers. DNA concentrations were quantified after each extraction and each sample was put in a 96 wells-plate for PCR amplification using either SC1 or SC3 as primer. For each primer, both the sensitivity and the detection limits were quantified by determining Ct values after amplification process for each cellular sample.

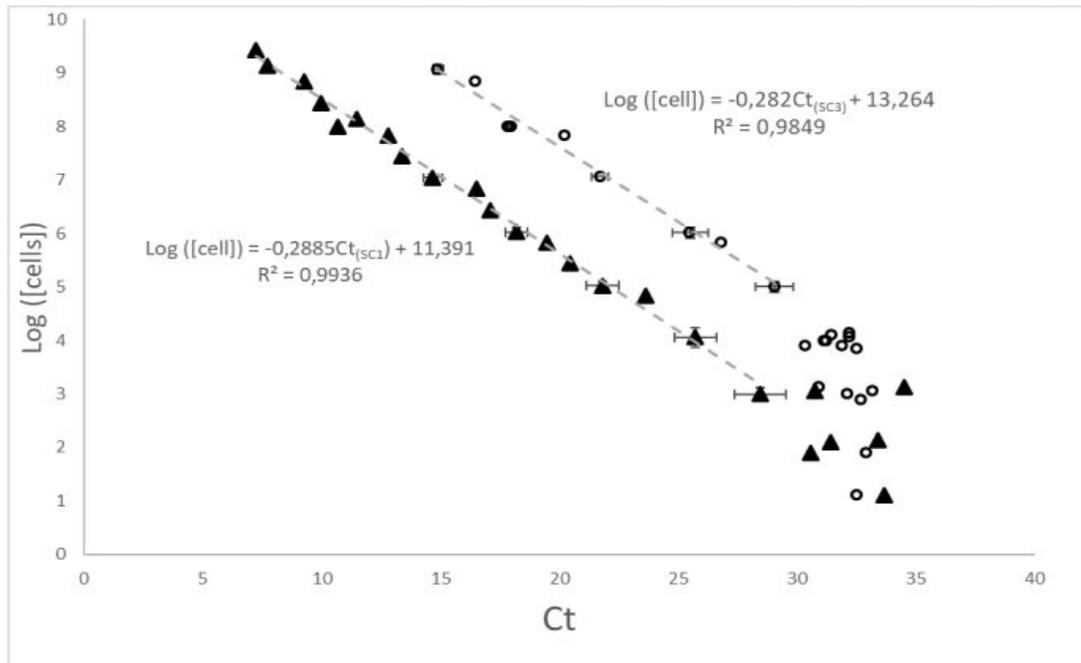


Figure 2 : Calibration curves obtained using either SC1 primer (black triangle) or SC3 primer (empty circle).

Calibrations were made using extractions on pure cell suspensions. Each concentration was analyzed in triplicate with 3-decade dilutions.

Figure 2 showed the correlation curves obtained for each primer used (SC1 and SC3). For

SC1 primer, the range covered by the method was from 10^3 cells/mL up to 10^9 cells/mL with a regression coefficient of 0.994. Error bars were calculated both for the two axis. The standard deviation for the Y-axis were found very weak (less than 0.8 %) and the standard deviations for Ct values increased from 0.1 % up to 3.8% from the weakest cell concentration (10^3 cells/mL equivalent to 12 pg genomic DNA/mL). Regarding results using SC3 primer, even if the correlation slope was nearly the same, the range in terms of amplification was lower. At the same maximum value of Ct (30), the calculated cell concentration was 10^5 cells/mL whereas a 100-fold lower cell concentration can be calculated using SC1 primer. This is mainly due to the number of copy of the target sequence, 5 copies per genome of SC1 target, and one copy per genome of the SC3 target. The higher the number of copy, the higher the sensitivity and thus, the detection level of the PCR method. The limit of the method in terms of Ct values was fixed at 30; indeed, using SC1 primer, a Ct value higher than 30 did not allow to discriminate the real concentration between 10^2 and 10^3 cells/mL; using SC3 primer, at the same Ct value (higher than 30), the method

was not accurate enough to discriminate a cell concentration of 10^4 cells/mL regarding 10^3 cells/mL.

3.3.2 Impact of the quality of hydrolysates on cell quantifications.

The impact of the quality of the hydrolysates (i.e. the level of hydrolysis, and thus, the importance in terms of hydrolyzed fibers) was evaluated by adding a fixed quantity of a 72 hours hydrolysis sample to different cell suspensions at different cell concentrations.

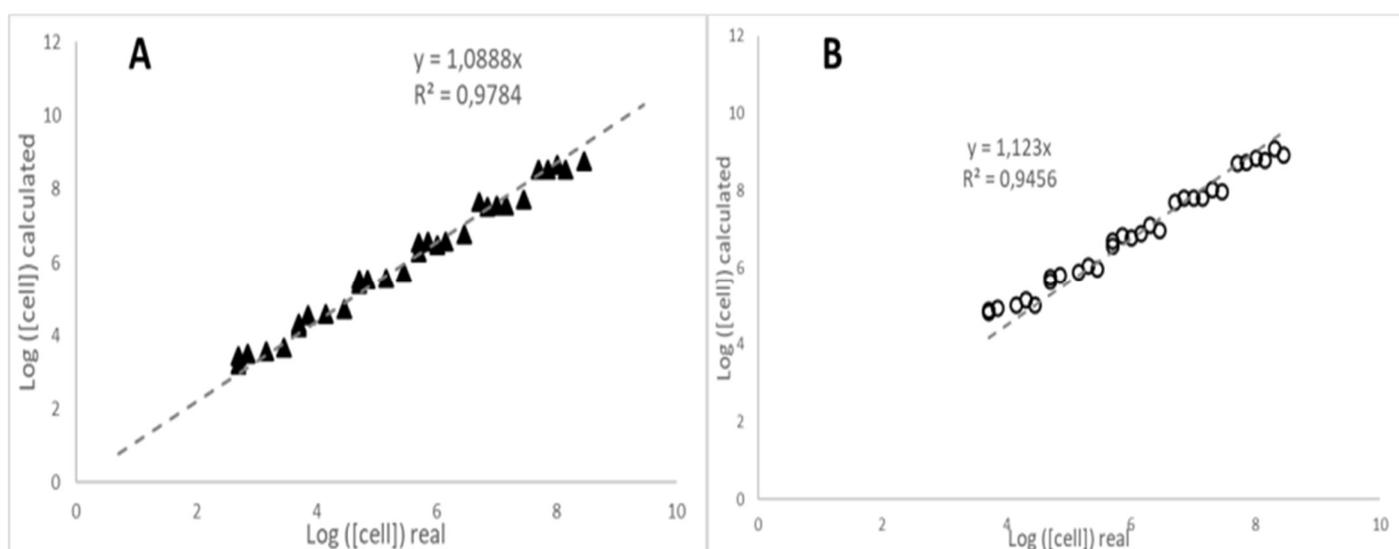


Figure 3 : Impact of hydrolysate quality on cell concentration quantifications using (A)

SC1 primer and (B) SC3 primer.

Figures 3 A) and B) plotted the cell concentration in the samples (in Log plot) versus those calculated using either the SC1 primer correlation or the SC3 primer one obtained before. As figures showed, in the defined Ct range for each primer, it was possible to calculate cell concentrations with 9 % accuracy using SC1 correlation and 12 % accuracy using SC3 correlation. As discussed before, the cell concentration range obtained using SC1 primer is higher than those obtained using SC3 primer confirming that using a multicopy system allowed increasing the quantification range. Our results can be compared to those of Simeng et al (2015). In this work, fungal biomass growing in solid state fermentation, was quantified as mycelium dry weight (in mg) which was correlated first to genomic DNA quantity (in ng) obtained by PCR

with 29% estimated errors on known samples and up to 38% regarding the targeted specie. 10^{-4} ng/ μ L genomic DNA can be quantified using a multi-targeted system whereas our quantification level is 10-fold lower ($1.2 \cdot 10^{-5}$ ng/ μ L).

3.4 Quantification of growth during fermentation of lignocellulosic hydrolysates

A first validation was carried during a “real” fermentation process using bioextruded pretreated Sweet Corn Cob as substrate under aeration conditions and the measurements of outlet gas composition. The must was inoculated at 30°C after 48 hours hydrolysis (this step was realized at 50°C). The pH was fixed at 5. Inoculated at 10%, the initial concentration of yeasts on the bioreactor was: 2.15×10^7 cells per mL corresponding to an initial cell dry weight concentration of 0.91 g/L.

Different samples were taken during the fermentation. DNA extractions were made and the two primers were used to quantify the cell concentration versus time. Due to the presence of insolubles, any classical cell quantification (i.e. OD measurements, cell dry weight, flow cytometry) cannot be used on these samples. A mathematical approach were used to estimate the cellular biomass production. Based on quantifications on both substrates (glucose and xylose concentrations, oxygen consumption) and products (ethanol, glycerol, acetic acid, CO₂), it was possible to calculate the biomass production using elementary balances (both on mass and reductive degree) (figure 4, grey line). In parallel, concentrations measured by PCR method were calculated as dry weight concentration (using the correlation obtained in mineral media) and plotted as symbols on figure 4. Each sample was analyzed in triplicate with 3 decade dilutions. Error bars were determined using all dilutions for a sample.

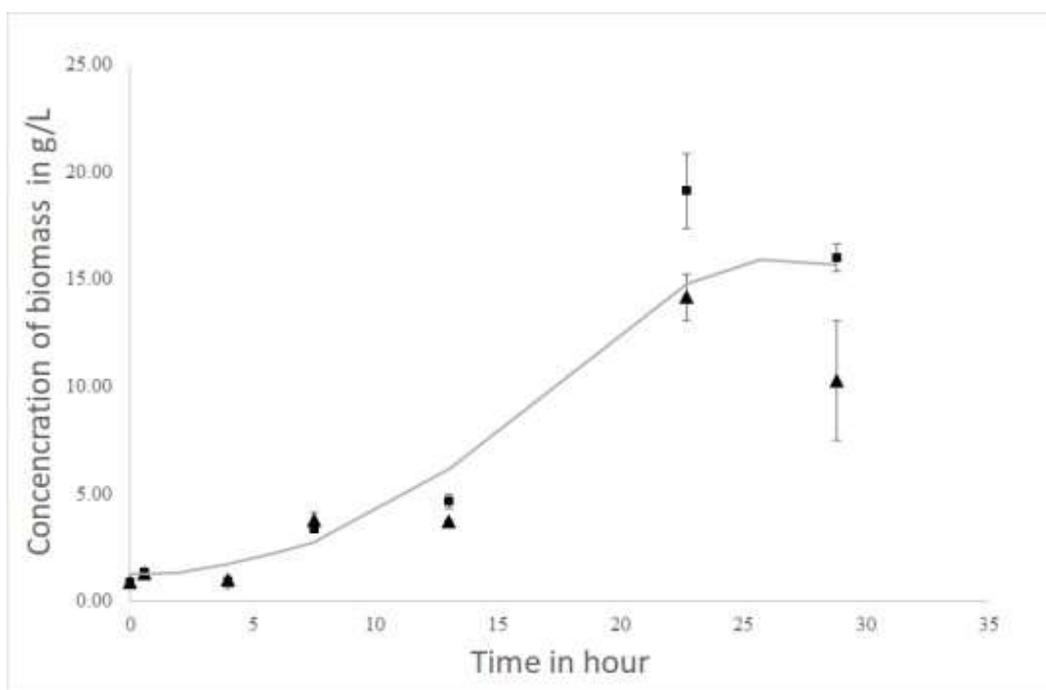


Figure 4 : Growth kinetic during the fermentation of lignocellulosic hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae*. Biomass determined by qPCR was represented with square for SC1 primer and triangle for SC3 primer. The grey line corresponds to the biomass calculated with mathematical calculations.

As shown, the results obtained are close to the calculated ones. This confirms that the developed PCR method is relevant to quantify biomass growth in complex lignocellulosic fermentation broth.

Conclusions

This paper proposes a method based on qPCR technique allowing the quantification of yeasts' concentrations during fermentation on lignocellulosic hydrolyzed media. Using only 200 mg of culture sample and two different couple of primers (SC1 and SC3), a large yeast concentration range can be measured (between 10^3 and 10^9 cells/mL i.e. 6 decades) without any dilution of the complex culture sample. As a conclusion, quantifying cell growth accurately during lignocellulosic fermentations will improve the optimization of the process by getting access to the catalytic fraction of the microbial reaction.

Funding

This work was supported by the European Community (Horizon 2020- BABET-REAL 5 PROJECT) [grant number 654365, 2015].

References

- Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., Querol, A., 2017. Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* Wine strain in wine fermentation: Competition, physiological fitness, and influence in final wine composition. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00150>
- Candido, R.G., Mori, N.R., Gonçalves, A.R., 2019. Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 142, 111845. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111845>
- Fujii, T., Murakami, K., Endo, T., Fujimoto, S., Minowa, T., Matsushika, A., Yano, S., Sawayama, S., 2014. Bench-scale bioethanol production from eucalyptus by high solid saccharification and glucose/xylose fermentation method. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 749- 754. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1032-1>
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148- 7155. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-06>
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamón, J.M., 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by realtime quantitative PCR. *FEMS Yeast Res.* 7, 1340- 1349. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00304.x>
- Huang, J., Wu, J., Li, C., Xiao, C., Wang, G., 2009. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1729- 1739. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04364.x>
- Liu, Y.J., Li, B., Feng, Y., Cui, Q., 2020. Consolidated bio-saccharification: Leading lignocellulose bioconversion into the real world. *Biotechnol. Adv.* 40, 107535. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107535>
- Malik, K., Salama, E.S., Kim, T.H., Li, X., 2020. Enhanced ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation post acidic and alkali chemical pretreatments of cotton stalk lignocellulose. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 147, 104869. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104869>
- Malorny, B., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., Paccassoni, E., 2004. Diagnostic Real-Time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7046- 7052. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7046>
- Martorell, P., Querol, A., Ferna, M.T., 2005. Rapid Identification and Enumeration of. *Society* 71, 6823- 6830. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6823>
- 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. *Biochem. Biophys. Reports* 10, 52- 61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

- Salinas, F., Garrido, D., Ganga, A., Veliz, G., Martínez, C., 2009. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiol.* 26, 328- 332. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.001>
- Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z., Morrison, M., Firkins, J.L., 2004. Development of an Assay to Quantify Rumen Ciliate Protozoal Biomass in Cows Using Real-Time PCR. *J. Nutr.* 134, 3378- 3384. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3378>
- Wang, X., Glawe, D.A., Weller, D.M., Okubara, P.A., 2020. Real-time PCR assays for the quantification of native yeast DNA in grape berry and fermentation extracts. *J. Microbiol. Methods* 168, 105794. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105794>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 71, 475- 501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>