Etude des possibilités de production d'éthanol hémicellulosique dans le cadre d'une bioraffinerie papetière.

Jérémy Boucher

▶ **To cite this version:**

Jérémy Boucher. Etude des possibilités de production d'éthanol hémicellulosique dans le cadre d'une bioraffinerie papetière.. Génie des procédés. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENI037 . tel-01278355

HAL Id: tel-01278355
https://theses.hal.science/tel-01278355

Submitted on 24 Feb 2016

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Mécanique des Fluides, Énergétique, Procédés**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jérémy BOUCHER

Thèse dirigée par **Christine CHIRAT**
et codirigée par **Dominique LACHENAL**

préparée au sein du **Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers UMR CNRS 5518**
dans **l'École Doctorale Ingénierie – Matériaux, Mécanique, Énergétique, Environnement, Procédés de Production**

Étude des possibilités de production d'éthanol hémicellulosique dans le cadre d'une bioraffinerie papetière

Thèse soutenue publiquement le **16 juin 2014**,
devant le jury composé de :

Mme Ana Paula DUARTE
Professeur à l'University of Beira Interior, Portugal, Président, Rapporteur
Mme Carole MOLINA JOUVE
Professeur à l'INSA Toulouse, Rapporteur
M. Antoine MARGEOT
Docteur, IFP Énergies Nouvelles, Membre
Mme Christine CHIRAT
Maître de Conférences, Grenoble-INP, Directrice de thèse
M. Dominique LACHENAL
Professeur, Grenoble-INP, Co-Directeur de thèse

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

If knowledge can create problems, it is not through ignorance that we can solve them
Dr Isaac Asimov

Remerciements

En premier lieu, il me semble important de remercier mes encadrants : ma directrice de thèse Mme Christine Chirat et mon co-directeur M. Dominique Lachenal. Je vous suis reconnaissant de m'avoir choisi pour cette thèse, et j'espère avoir un tant soit peu répondu à vos attentes. Comme je l'avais mentionné lors de la soutenance, j'ai particulièrement apprécié la façon de travailler de Mme Chirat, à laquelle j'ai adhéré sans problème.

Je tiens particulièrement à remercier les autres membres de mon jury, Mme Ana Paula Duarte, Mme Carolina Jouve et M. Antoine Margeot. Je vous remercie d'avoir pris le temps d'étudier mon manuscrit et d'avoir enrichi ma soutenance de thèse par vos remarques et conseils avisés.

Merci également aux autres personnes m'ayant activement aidé pendant ma thèse. Merci à Gérard Mortha pour, entre autres, ses contrepèteries, ses conseils sur les analyses chromatographiques et qui a eu (l'inconscience ?) de me désigner à peine quelques mois après mon arrivée responsable du tout nouveau et tout coûteux appareil d'analyse. Merci à Javier Carvajal Barrigar qui a grandement contribué à la partie fermentation de par son expertise et à Agnès Guillet pour m'avoir permis d'utiliser son laboratoire de microbiologie, et qui m'a prodigué quelques bons conseils pour mes débuts dans l'utilisation de levures. Je voudrais enfin remercier ici Karine Janel, toujours volontaire pour aider les doctorants en détresse, et David Dallerac, le M. Propre du labo, un peu maniaque mais toujours présent quand on a besoin de lui (tant qu'il n'est pas en congé bien sûr…). Tu n'es pas toujours ménagé par les doctorants, mais c'est parce qu'on t'aime bien.

Un grand merci également à ma colocatrice de bureau Marie-Christine Brochier-Salon, même si l'on ne s'est pas croisé beaucoup ces derniers temps. Je lui dois toutes mes connaissances sur la RMN, même si je n'ai pas encore eu l'occasion de les utiliser. Merci aussi pour les bugnes au nom de tout le personnel, même si j'avoue en avoir profité plus que d'autres.

Ayant eu la chance d'encadrer travaux pratiques, voyage d'étude et autres APP (apprentissage par projet) pendant trois ans à l'école, je tiens à exprimer ma gratitude envers les enseignants avec qui j'ai travaillé. Cette expérience m'a été très enrichissante. Je ne sais pas si une occasion d'enseigner se représentera un jour, mais j'aurais eu la chance de le vivre au moins une fois. Je pense à Jean-Francis Bloch, Pierre Dumont et Céline Martin pour les TP en papeterie, et à Mazen Mahrous pour l'APP de base de donnée en informatique (l'essentiel de mes connaissances en ce domaine, en plus des cours donnés par Mazen quand j'étais étudiant, provenant de « Access 2010 pour les nuls », lu lors d'un périple en train entre Amsterdam et Eindhoven). Enfin, je remercie plus particulièrement José Garrido, tant d'expérience à 30 ans à peine (le secret de la jeunesse éternelle : grimper à la bastille une fois par semaine, sans prendre les bulles), en souvenirs des TPs, du voyage d'étude, du port perdu d'Épinal, d'une soirée épique à Reims et des après- Méchoui.

Je tiens à remercier également les autres membres du personnel permanent, avec qui j'ai pu passer des bons moments, que ce soit à la cafet ou ailleurs : Emmanuelle et Naceur Belgacem, Didier Chaussy, Denis Curtil, Manuel Duarte (notamment pour avoir réparé mon costume de Père Noël à l'agrafeuse un soir de raclette de Noël), Isabelle Dufreney, Stéphane Dufreney, Elisabeth « Beth » Foures, John-Francis « JFK » Kenwright, Bertine Khelifi, Chu et Charlotte Ly Bliamay, Brigitte Manship, Alain Maréchal, Nathalie Marlin, Evelyne Mauret, Frédéric

Munoz, Raphaël Passas, Anne-Marie Piédémonte et ses anecdotes sur l'école depuis les années 70 (au moins), Aurélie Rattaz, Nadège Reverdy-Bruas, Olivier Ruchier, Stéphane Vernac et sa gigantesque calculatrice qui doit être antérieure à l'invention du boulier.

On a affirmé à la fin de ma soutenance de thèse que j'étais toujours d'humeur égale, toujours souriant. La raison première est sûrement que je savais que j'allais croiser tous les jours des amis, des gens formidables. Je tiens à vous remercier d'avoir été là et d'être ce que vous êtes :

Les vieux de la vieille, avec qui j'ai fait mes classes à Pagora : Frédéric (ou Pit) bien sûr, pour tous les bons moments passés dans les labos, à Grenoble, dans le Var, à Nîmes ou encore à Vancouver (la thèse, c'est cool !!!). Elsa peut-être la personne la plus altruiste que je connais. Reste comme ça, c'est toi qui a raison. Nicolas, Fufu, en mémoire des randonnées avec ou sans raquettes, des via ferratas et du blockbuster Toxic Mountain (et de sa suite).

Les prédécesseurs, qui étaient là avant moi : Lucie, qui a toujours été là pour m'aider au début de ma thèse. Je peux en dire autant de Marion, qui restera en outre pour toujours comme la première Shérif du labo et qui m'a supporté une semaine à Helsinki. Satyajit, qui a inventé se propre langue, mélange d'anglais et de français, et dont les dons de prestidigitateurs se sont révélés au grand jour un soir de conférence à Vancouver. Lara, le dictateur le plus sympa que je connais. Je pourrais mentionner les randonnées, les séances de jogging sur les bords de l'Isère ou les séances de yoga, avec plus ou moins de succès... Jean-Baptiste, avec qui j'ai partagé le déjeuner un nombre incalculable de fois, souvent agrémenté de passionnantes discussion (on attend toujours des nouveaux arceaux pour les vélos, la lutte continue !!!).

Les autres : Oussama, fidèle compagnon de sport, que ce soit football, volleyball, vélo, squash, tennis, footing, palet breton, pétanque… (à quand le match de cricket que tu m'avais promis ?). Ahlem, qui est une excellente baby-sitter pour plantes vertes et qui a participé à l'élaboration de mon buffet de thèse en mettant à disposition son four. Kenza, qui fut ma mère Noël et qui m'a suivi jusqu'à distribuer déguisée des bonbons aux étudiants de l'école. Elsa (Walger), qui, comme toute Elsa qui se respecte, est toujours là pour les autres. Claire, chocolatophile, actuelle Shérif du labo, qu'il vaut mieux avoir dans son équipe de Trivial Pursuit que contre soi (il y a un point-virgule mal placé dans cette thèse, à toi de le trouver). Benoit et son esprit de contradiction légendaire, qui nous impose d'écouter Lucho sur RMC tous les après-midi de tour de France. Fanny (Bardot), conseillère technique pour mon périple en Corse (elle connait mieux le catalogue du Vieux Campeur que le plus vieux des campeurs), qui fait une thèse en hommage à l'une de ses idoles, le docteur. Jennifer, qui, en qualité de voisine, a surveillé la cuisson de quelques quiches et cakes pour mon pot de thèse, surement en lisant un thriller de Maxime Chattam. Jordan, en souvenir d'un bivouac plutôt venteux au sommet de la dent de Crolles et qui est au Shérif ce que Joe Dalton est à Lucky Luke. Fanny (Hoeng), qui fut l'une de mes premières élèves quand j'ai commencé mes TP (ce qui ne me rajeunit pas). Thomas le pharmacien, parfois appelé affectueusement l'usurpateur. Souviens-toi de ton serment, je serais tellement déçu d'apprendre que t'as été couvert d'opprobre et méprisé par tes confrères. Lorenzo, qu'il ne faut pas déranger un soir de match de la Juve. La colonie brésilienne composée de Carolina, Bruno, Ana, Daniele, Fernando, Tamires et Talyta. Virginie, que l'on a malheureusement moins vue en chimie quand les analyses sont devenues payantes. Mais aussi Lamia, Alexandre, Raphaël et Maëlle. Et Bevan le disparu.

Et enfin pour terminer, les personnes qui m'ont inspiré et motivé à faire une thèse, les docteurs Isaac Asimov, Emmett Brown, Daniel Jackson, Samantha Carter, Meredith Rodney McKay et Henry Jones Junior.

Table des matières

Remerciements **5**

Table des matières **7**

Introduction générale **13**

Chapitre I : Revues bibliographique **15**

A. La biomasse lignocellulosique 15
1 Composition globale des matières premières lignocellulosiques 15
2 La cellulose 16
3 Les hémicelluloses 17
3.1 Galactoglucomannanes et glucomannanes 17
3.2 Xylanes 18
3.3 Autres hémicelluloses 20
3.4 Lignine 20
3.5 Extractibles 22
3.6 Composés inorganiques 22

B. Concept de bioraffinerie 22
1 Définition 22
1.1 Plateforme thermochimique 24
1.2 Plateforme sucre 25
2 De l'usine Kraft à la bioraffinerie 26
2.1 Procédé kraft 26
2.2 Cuisson au sulfite 32
2.3 Adapter une usine kraft à la bioraffinerie 32
3 Extraction des hémicelluloses 34
3.1 Autohydrolyse et hydrolyse acide 34
3.2 Extractions alcalines 44
3.3 Explosion à la vapeur 47
3.4 Hydrolyse enzymatique 48

3.5 Bilan sur les extractions 48

C. La production de bioéthanol 49
1 Le point sur les biocarburants 49
2 La fabrication de bioéthanol 57
2.1 Concept de fermentation éthanolique 57
2.2 Inhibition de la fermentation 61
2.3 Procédés réduisant l'impact des inhibiteurs 65
2.4 Acclimatation des microorganismes 66
2.5 Procédés de fermentation 67
2.6 L'extraction de l'éthanol 70

D. Conclusion 72

Chapitre II : Extraction des hémicelluloses 73

A. Composition du bois 73

B. Prétraitements 74
1 Autohydrolyse et hydrolyse acide 75
1.1 Caractéristiques de l'hydrolysat 75
1.2 Composition des copeaux après les traitements d'hydrolyse 78
1.3 Problématique de la récupération de tous les saccharides solubilisés et impact sur le potentiel de production d'éthanol 82
1.4 Bilan sur les préhydrolyses effectuées en milieu acide 84
2 Extractions en milieu alcalin 85
2.1 Cold Caustic Extraction 85
2.2 Extraction alcaline 86
2.3 Extraction en milieu quasi-neutre 87
3 Bilan sur les prétraitements 88

C. Traitement d'hydrolyse secondaire 90
1 Hydrolyses secondaires en milieu acide 90
1.1 Essais préliminaires 90
1.2 Optimisation de l'hydrolyse secondaire 98
2 Hydrolyse secondaire des hydrolysats par voie enzymatique 104
2.1 Comparaison de l'efficacité des deux types d'enzymes 105

2.2 Utilisation des enzymes en série 107
2.3 Utilisation des deux enzymes simultanément 109
3 Conclusion sur les hydrolyses secondaires 109

D. Etude des possibilités d'augmenter la concentration en saccharides de l'hydrolysat ... 110
1 Effet de l'évaporation flash 110
2 Effet de l'évaporation 111
3 Effet du ratio Liqueur sur bois 112
3.1 Composition des hydrolysats 113
3.2 Saccharides effectivement disponibles à la fermentation 114
4 Recyclage des hydrolysats 115
4.1 Recyclage des hydrolysats en utilisant un ratio L/B de 4 116
4.2 Optimisation pour atteindre 60 g/L d'hexoses 117
4.3 Recyclage à quantité de bois constante 119
5 Conclusion 122

E. Résumé du chapitre 122

Chapitre III : Fermentations 123

A. Fermentations directes d'hydrolysats 123
1 Rendements de fermentation 124
2 Impact de la fermentation sur les inhibiteurs 126

B. Impact des inhibiteurs sur la fermentation 127
1 Effet des furanes, extraits du bois et lignosulfonates 129
1.1 4h de fermentation 129
1.2 24 heures de fermentation 130
1.3 48 heures de fermentation 132
2 Effet des acides organiques 132
2.1 4h de fermentation 132
2.2 24h de fermentation 133
2.3 48h de fermentation 134
3 Effet simultané du HMF, du furfural et de l'acide acétique 136
4 Bilan sur l'étude de l'impact des inhibiteurs 137

C. Acclimatation de levures 137

1 Première série d'essais d'acclimatation 139
2 Seconde série d'essais d'acclimatation 140
2.1 Rendements de fermentations 140
2.2 Impacts sur les furanes 142

D. Résumé du chapitre 143

Chapitre IV : Aspects technico-économiques 145

A. Marché potentiel pour la production de bioéthanol dans les usines kraft 145

B. Aspects économiques de la fabrication d'éthanol hémicellulosique dans une usine kraft 146
1 Etude d'un procédé utilisant l'extraction en milieu quasi-neutre 146
1.1 Impact sur la balance énergétique 146
1.2 Impact sur la balance économique 147
2 Etude d'un procédé utilisant l'extraction alcaline des hémicelluloses 148
2.1 Impact sur la balance énergétique 149
2.2 Impact sur la balance économique 149
3 Etude d'un procédé utilisant l'hydrolyse acide des hémicelluloses 149
3.1 Impact sur la balance énergétique 150
3.2 Impact sur la balance économique 150
4 Autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire selon le procédé mis au point dans cette thèse 152
4.1 Procédé proposé 152
4.2 Avantages et inconvénients de ce procédé 154
5 Conclusion du chapitre 158

Conclusion générale 159

Chapitre V : Matériels et méthodes 163

A. Matière première et réactifs 163
1 Bois utilisé 163
2 Produits utilisés 163

B. Extraction des hémicelluloses 164
1 Réacteurs utilisés 164
1.1 Multi-obus ERTAM 164
1.2 Mini multi-obus 164
2 Extractions 165
3 Hydrolyses secondaires 166
3.1 Hydrolyses acides 166
3.2 Hydrolyses enzymatiques 167
4 Calcul des teneurs en hexoses et pentoses extraits 168
5 Evaporation de l'hydrolysat 169

C. Fermentation 169
1 Fermentations d'hydrolysats et étude des inhibiteurs 169
2 Acclimatation des levures à un hydrolysat concentré 170
2.1 Constitution des milieux de culture 170
2.2 Solutions utilisées pour l'acclimatation 170
2.3 Acclimatation 170

D. Analyses 172
1 Teneur en saccharides 172
1.1 Analyse des monosaccharides 172
1.2 Analyse des polysaccharides 173
2 Teneur en autres composés 174
3 Composition des copeaux 176
3.1 Extraits 176
3.2 Composition en saccharides 176
3.3 Teneur en lignine klason et lignine soluble dans l'acide 177
3.4 Calcul de la composition en hémicelluloses et cellulose 179

Annexe I : les procédés de détoxification 193

A. Procédé alcalin (*overliming*) 193

B. Résines échangeuses d'anions 196

C. Charbons actifs 196

D. Evaporation 197

E. Détoxification par voie enzymatique 197

F. Détoxification biologique 197

G. Addition de produits chimiques 198

H. Conclusion sur les traitements de détoxification 198

Annexe II : Détails de l'étude technico économique 199

A. Etude d'un procédé utilisant l'extraction en milieu quasi-neutre 199

B. Etude d'un procédé utilisant l'extraction alcaline des hémicelluloses 202

C. Etude d'un procédé utilisant l'hydrolyse acide des hémicelluloses 203

Annexe III : Calculs économiques 205

Introduction générale

La limitation de la consommation de carburants issus de la pétrochimie est devenue l'un des enjeux majeurs de ce début de XXIème siècle. Leur utilisation, en hausse constante, représente un facteur important de la pollution atmosphérique et a donc des répercussions non négligeables sur le réchauffement climatique et sur la santé humaine. De plus, la limitation, voire la diminution, de la consommation de carburants permettrait de restreindre l'utilisation de ressources pétrolières de plus en plus limitées, et de réduire la dépendance énergétique de certains pays, notamment celle des nations européennes, envers les pays exportateurs de pétrole. Relever ce défi ne peut se faire sans la mise en place d'une série de mesures, comme la modification des habitudes des usagers, la diminution de la consommation des véhicules ou l'utilisation de carburants alternatifs comme le gaz, l'électricité, l'hydrogène ou les biocarburants.

Les biocarburants sont les carburants alternatifs les plus simples à mettre en place, puisqu'ils ne nécessitent pas de véhicules adaptés et le développement d'un réseau de distribution d'énergie, contrairement notamment aux véhicules électriques, à air comprimé ou à hydrogène. Produits à partir de biomasse, ils sont renouvelables et *a priori* moins polluants que leurs homologues pétroliers, puisque le dioxyde de carbone produit par leur combustion provient du de celui capté dans l'atmosphère lors du développement de la plante. Le biodiesel, élaboré à partir d'huiles végétales, peut parfaitement se substituer au diesel classique. Son pendant concernant l'essence est l'éthanol, qui peut être incorporé jusqu'à hauteur de 10% pour la majorité des véhicules produits actuellement. Il est conçu via la fermentation de sucres provenant de canne à sucre, de betterave ou de céréales. L'utilisation de telles ressources alimentaires a été mise en cause dans la hausse des cours de certaines denrées alimentaires, et pose de toute manière des problèmes éthiques alors que, d'après l'ONU, plus de 840 millions de personnes souffrent de malnutrition dans le monde.
L'avenir du bioéthanol passe alors par le développement d'une nouvelle génération, fabriquée à partir de matière lignocellulosique qui n'est pas utilisée dans l'alimentation humaine. Cette seconde génération exploite les saccharides composant la cellulose et les hémicelluloses de la biomasse, les extrayant et les fermentant sous forme d'éthanol. L'utilisation d'éthanol de seconde génération comme carburant est plus bénéfique pour l'environnement que la première génération, et a un impact bien plus faible sur les ressources alimentaires. Néanmoins, le procédé de fabrication n'est pas encore mature.

L'utilisation de la biomasse pour produire des substituts aux produits pétroliers est à l'origine du concept de bioraffinerie. Une bioraffinerie, par analogie à la raffinerie pétrolière exploitant chaque constituant du pétrole, est une installation permettant de valoriser de manière optimale chaque composant de la biomasse sous forme de matériaux, produits chimiques, carburants ou énergie. Une usine de pâte kraft incarne parfaitement ce concept. La pâte à papier fabriquée selon le procédé kraft représente aujourd'hui 75% de la production de pâte à papier vierge dans le monde. Une usine kraft extrait et vend des produits chimiques provenant des extraits du bois, comme la térébenthine ou le tall-oil. De plus, une telle usine est excédentaire en énergie grâce à la combustion de la lignine extraite du bois. Cependant, l'ensemble de la biomasse n'y est pas valorisé de manière optimale. En effet, les hémicelluloses, constituant 25 à 30% du bois, sont en majorité brûlées afin de produire de l'énergie, particulièrement lors de l'utilisation de bois de résineux comme matière première. Or, leur pouvoir calorifique relativement faible n'en fait pas un candidat idéal à la production d'énergie par combustion. De plus, les hémicelluloses sont

des polymères constitués de sucres qui peuvent être potentiellement valorisés, par exemple par fermentation en éthanol. L'objet de cette étude sera donc l'utilisation de ces hémicelluloses pour la production de bioéthanol au sein d'une usine de pâte kraft.
La législation européenne et nord-américaine encourage fortement l'incorporation d'énergies renouvelables dans les transports. La demande en éthanol ne peut donc que croître dans les futures années. De plus, l'extraction des hémicelluloses pourrait permettre à une telle usine de produire, à la place de pâte à papier, de la pâte à dissoudre, qui constitue un produit à plus haute valeur ajoutée. La production de bioéthanol, mais aussi de pâte à dissoudre, constituerait de nouveaux débouchés et de nouvelles sources de revenus pour une industrie en difficulté qui a besoin de se diversifier, notamment en Europe et en Amérique du Nord. Dans ces régions, les usines souffrent de la concurrence venue d'Amérique du Sud et d'Asie où les usines sont plus modernes et le prix des matières premières très avantageux.

L'objectif de cette étude est de proposer un procédé complet et industriellement applicable, permettant la production simultanée de cellulose et d'éthanol dans une usine de pâte kraft.

Le chapitre I sera constitué d'une revue bibliographique décrivant l'état de l'art sur la production d'éthanol de seconde génération en général, et dans une usine de pâte kraft en particulier. Elle s'intéressera plus particulièrement aux différents procédés d'extraction des hémicelluloses, et notamment leur impact sur la fermentation subsidiaire en éthanol. L'une des principales différences entre les deux générations d'éthanol est que la seconde nécessite la fermentation d'une solution contenant une myriade de composants formés durant l'extraction des sucres fermentescibles, et qui pour certains sont néfastes à la fermentation. Dans le cas particulier de cette étude, la limitation de l'impact du procédé sur les fibres destinées à la fabrication de pâte constitue également un facteur important à prendre en compte.

Le chapitre II sera consacré à l'étude des différents procédés d'extractions et d'hydrolyse des hémicelluloses, sélectionnés d'après le chapitre précédent. L'attention sera particulièrement portée sur la composition des hydrolysats, le but étant de trouver le meilleur compromis entre la quantité d'hémicelluloses extraite et les concentrations en espèces connues pour inhiber la fermentation.

Le chapitre III sera dédié à la fermentation des hexoses résultants de l'hydrolyse des hémicelluloses. Certains hydrolysats obtenus dans le chapitre II seront fermentés directement. Une étude de l'impact de chaque espèce inhibitrice de la fermentation sera effectuée. Enfin, la production d'éthanol sera optimisée en soumettant plusieurs souches de levures à un procédé d'acclimatation.

Le chapitre IV constitue une étude technico-économique de la production d'éthanol dans une bioraffinerie papetière. Elle revient notamment les conclusions de trois études afin de déterminer les avantages économiques des procédés mis au point dans les chapitres précédents.

Les résultats des chapitres II à IV sont principalement basés sur des expériences en laboratoire dont les méthodes sont décrites dans le chapitre V.

Chapitre I : Revues bibliographique

A. La biomasse lignocellulosique

La biomasse végétale terrestre constitue la matière première utilisée dans cette thèse. Il est donc important, avant toute chose, de la définir. Elle est habituellement divisée en trois catégories. La biomasse à glucide comprend l'amidon, composant des céréales et des tubercules, et le saccharose, provenant de canne à sucre ou de betterave. La biomasse oléagineuse regroupe quant à elle les différentes huiles végétales (palmier, soja, tournesol, colza,…). Enfin, la biomasse lignocellulosique compose le bois, les plantes annuelles, la bagasse de canne à sucre,... Elle est appelée ainsi étant principalement composée de cellulose et de lignine, mais elle comporte également les hémicelluloses. La biomasse lignocellulosique est majoritaire. La cellulose est ainsi le polymère présent en plus grande quantité sur la Terre [1]. Environ 10^{11} tonnes de cellulose sont synthétisées annuellement dans le monde [2]
Il s'agit de cette biomasse lignocellulosique, et plus spécifiquement celle composant le bois, qui est utilisée dans cette thèse.

1 Composition globale des matières premières lignocellulosiques

La biomasse lignocellulosique est donc constituée avant tout de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, mais comprend aussi, en faible quantité, des extractibles (matières pouvant être extraites avec certains solvants) et des cendres. Le bois est constitué de fibres, elles-mêmes composées principalement de cellulose. La lignine et les hémicelluloses forment une matrice qui maintient les fibres entre elles, comparable à un ciment. Une partie de la lignine est également incluse dans les parois des fibres.

Les essences d'arbres sont classées en deux catégories, les résineux (ou conifères) et les feuillus. Cette disparité, visible à l'œil nu, s'applique également au niveau de leur fonctionnement, de leur composition ou de leur utilisation. Les fibres de résineux sont par exemple plus longues que celles de feuillu, et sont donc employées de manière différente dans la fabrication du papier. Les proportions de cellulose, hémicellulose et lignine varient également de manière significative selon les espèces. En moyenne, le bois de feuillu contient moins de lignine que le bois de résineux [3], [4]. Cependant, comme l'illustre le Tableau 1, les proportions entre les composants principaux du bois varient surtout en fonction des espèces. La paille des plantes annuelles et la bagasse de canne à sucre ont généralement une plus faible teneur en lignine comparée au bois.
En outre, de nombreuses différences existent dans la composition de la lignine, et surtout des hémicelluloses, entre les différents types de matière première lignocellulosique, ce qui dictera leur utilisation.

Résineux	Référence	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine
Epicéa commun *(Picea abies)*	[5]	40	31	28
Epinette blanche (*Picea glauca)*	[6]	41	31	27
Sapin baumier *(Abies balsamea)*	[6]	42	27	29
Pin blanc *(Pinus strobus)*	[6]	41	27	29
Pruche du Canada *(Tsuga canadensis)*	[6]	41	23	33
Thuya *(Thuja occidentalis)*	[6]	41	26	31
Mélèze laricin *(Larix laricina)*	[5]	44	25	29
Pin de Monterey *(Pinus radiata)*	[3]	38	33	27
Pin sylvestre *(Pinus sylvestris)*	[3]	41	30	27
Mélèze sibérien *(Larix sibirica)*	[3]	42	30	27
Feuillus				
Erable rouge (*Acer rubrum)*	[6]	45	29	24
Orme d'Amérique *(Ulmus americana)*	[6]	51	23	24
Peuplier faux-tremble *(Populus tremuloides)*	[6]	48	27	21
Bouleau à papier (*Betula papyrifera)*	[6]	42	38	19
Hêtre *(Fagus grandifolia)*	[6]	45	29	22
Plantes annuelles				
Switch grass *(Panicum virgatum)*	[4]	45	31	12
Paille de blé	[3]	30	50	15
Bagasse de canne à sucre	[3]	40	30	20

Tableau 1: Composition massique de différentes espèces d'arbres et de plantes annuelles (% par rapport à la masse sèche, après écorçage et extraction des extractibles) [3]–[6]

2 La cellulose

La cellulose est un polymère linéaire commun à toutes les espèces végétales, ayant pour motif monomère le cellobiose, lui-même étant un dimère composé de deux unités glucoses reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β-1,4 (Figure 1). De plus, des liaisons hydrogènes peuvent également se mettre en place au sein d'une même molécule. Il est à noter que le degré de polymérisation de la cellulose tient compte des unités glucose.

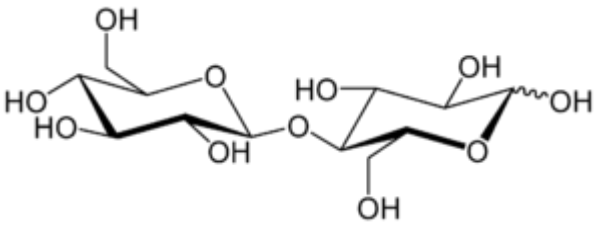


Figure 1 : Molécule de cellobiose

Le degré de polymérisation de la cellulose dans le bois avant tout traitement varie selon les espèces mais est généralement situé autour de 10 000 et peut atteindre 15 000 pour le coton [5]. L'une des extrémités de la cellulose est inerte, alors que l'autre est réductrice, formée d'un

aldéhyde. Les chaines de cellulose sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes, pour former des microfibrilles, puis des fibres. Au sein des microfibrilles se succèdent des zones cristallines et des zones amorphes, avec une légère prédominance pour les premières [5]. Ces zones cristallines s'avèrent constituer une protection aux traitements chimiques, contrairement aux hémicelluloses par exemple (cf. partie B.3 de ce chapitre)

3 Les hémicelluloses

Contrairement à la cellulose, qui est identique à toute espèce végétale, plusieurs polysaccharides se cachent sous la dénomination « hémicelluloses ». Leur nom, impropre, s'explique par leur degré de polymérisation plus faible par rapport à celui de la cellulose (il varie de 50 à 200 dans le bois [5]). En règle générale, les hémicelluloses sont des hétéropolymères pouvant être ramifiés. Ils sont constitués d'hexoses (glucose, galactose et mannose), de pentoses (xylose et arabinose) et d'acides uroniques. Le rhamnose et le fucose peuvent également entrer dans la composition des hémicelluloses, mais en faible quantité. Certains groupes hydroxyles sont substitués par des groupes acétyles. De même que pour la cellulose, les hémicelluloses possèdent une extrémité inerte et une autre réductrice.
D'une manière générale, les hémicelluloses de feuillus et de plantes annuelles sont constituées en majorité de pentoses, alors que celles de résineux comportent plutôt des hexoses (Tableau 2).

Résineux	Réf.	Xyl	Ara	Man	Gal	Rham	Acides uroniques	Groupes acétyles
Pin	[7]	5,3-1,6	2-4,2	5,6-13,3	1,9-3,8	-	2,5-6	1,2-1,9
Epicéa commun *(Picea abies)*	[3], [7]	5,2-10,2	1,0-1,2	9,4-15,0	1,9-4,3	0,3	1,8-5,8	1,4-2,4
Pin blanc *(Pinus strobus)*	[5]	7,6	1,7	8,1	3,8	-	5,2	1,2
Mélèze laricin *(Larix laricina)*	[7]	6,0	1,3	12,3	2,4	-	2,8	1,6
Sapin baumier *(Abies balsamea)*	[7]	5,2	1,1	10	1	-	4,8	1,4
Pin sylvestre *(Pinus sylvestris)*	[7]	7,6	1,5	12,4	1,8	-	5	1,6
Feuillus								
Erable	[3]	18,1-19,4	0,8-1	1,3-3,3	1	-	4,9	3,6-3,9
Tremble	[3]	18-27,3	0,7-4,0	0,9-2,4	0,6-1,5	0,5	4,8-5,9	4,3
Eucalyptus	[3]	14-19,1	0,6-1	1-2,0	1-1,9	0,3-1	2	3
Peuplier faux-tremble *(Populus tremuloides)*	[3]	21,2	0,9	3,5	1,1	-	-	3,9
Plantes annuelles								
Paille de blé	[7]	19,2-21,0	2,4-3,8	0-0,8	1,7-2,4	-	-	-
Paille de riz	[7]	14,8-23	2,7-4,5	1,8	0,4	-	-	-
Bagasse de canne à sucre	[7]	20,5-25,6	2,3-6,3	0,5-0,6	1,6	-	-	-

Tableau 2: Proportion des saccharides autres que le glucose, ainsi que des acides uroniques et des groupes acétyles pour différentes espèces (% par rapport à la masse sèche, après écorçage et extraction des extractibles) [3], [5], [7]

3.1 Galactoglucomannanes et glucomannanes

Les galactoglucomannanes (O-acétyl-galactoglucomannanes, appelés aussi GGM) sont les principales hémicelluloses contenues dans les résineux, en composant entre 15 et 25% de leur

masse (Figure 2) [6], [7]. Il s'agit de polymères ramifiés ayant une chaine principale composée d'unités mannose et glucose liées par des liaisons glycosidiques β-1,4. Des unités de galactose y sont parfois liées par des liaisons glycosidiques α-1-6. Les ratios entre unités mannose, glucose et galactose sont reportés dans le Tableau 3 pour certaines espèces de résineux. Les carbone C2 et C3 des constituants de la chaîne principale peuvent être acétylés, avec environ un groupe acétyle pour 3—4 hexoses [7].

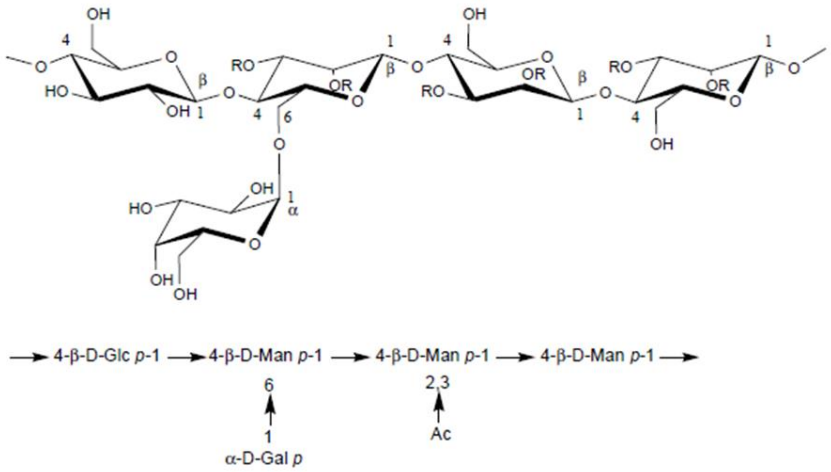


Figure 2 : Exemple de galactoglucomnnane de résineux [8]

	Ratios Mannose : glucose: galactose
Ginkgo biloba	3,6 : 1: 0,2
Mélèze de Sibérie *(Larix sibirica)*	3 : 1 : 1
Mélèze laricin *(Larix laricina)*	2,8 : 1 : 0,12
Epinette noire *(Picea mariana)*	3 : 1 : 1
Pin de Monterey *(Pinus radiata)*	3,7 : 1 : 0,13
Pin sylvestre *(Pinus sylvestris)*	2,8—4,3 : 1 : 0,2—0,26

Tableau 3 : Ratios mannose : glucose : galactose dans les GGM de certains résineux [5]

Les hémicelluloses de bois feuillus contiennent des glucomannanes en bien plus faibles quantités (3 à 5% par rapport au bois). Ce sont des polymères légèrement ramifiés, non acétylés, et qui ne comportent pas de galactose [3]. En moyenne, 1,5 à 2 unités mannose sont observées pour une unité glucose dans les bois feuillus [5]. Les résineux peuvent également comporter de tels glucomannanes en faible proportion [7].

3.2 Xylanes

Le xylane est l'hémicellulose prédominante dans le bois de feuillu, sous la forme d'O-acetyl-4-O-methylglucuronoxylane (Figure 3). Il entre à hauteur de 15 à 30% dans la composition globale du bois. La chaine principale de ce polymère est constituée d'unités xylose liées entre elles par des liaisons glycosidiques β-1,4. Des groupes 4-O-methylglucuroniques peuvent être liés par des liaisons α-1-2, à raison d'un groupe pour 10 unités xylose environ (Tableau 4 et

[7]). Des groupes hydroxyles, en C2 et C3, peuvent également être substitués par des groupes acétyles, selon un ratio de 3,5 à 7 groupes substitués pour 10 xyloses [6].

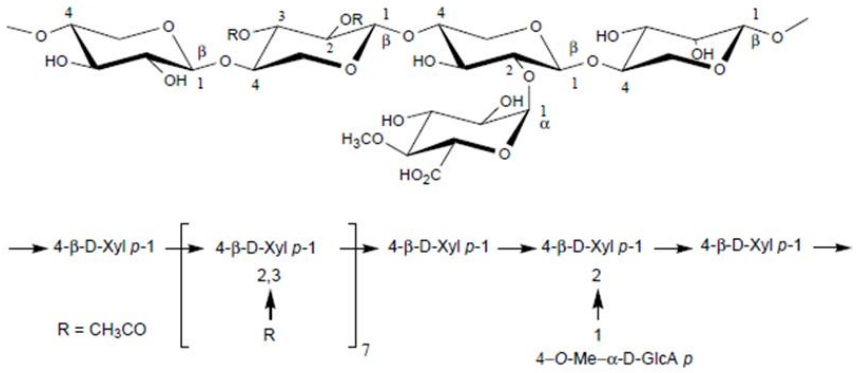


Figure 3 : Exemple de xylane de feuillus [8]

	Ratios Xylose : acide méthylglucuronique
Bouleau à papier (*Betula papyrifera)*	10—11 : 1
Erable argenté *(Asaccharum)*	10: 1
Eucalyptus globulus	10—11 : 1
Peulier noir *(Populus nigra)*	9,7 : 1
Peuplier faux-tremble *(Populus tremuloides)*	9 : 1

Tableau 4 : Ratios xylose : acide méthylglucuronique pour certains feuillus [5]

Les xylanes de résineux, présents à hauteur de 5 à 15% [3], [7], sont des arabino-4-O-méthylglucuronoxylanes. La chaine principale est toujours constituée de xylose, avec un degré de substitution par des groupes acétyles plus faible que pour les xylanes de feuillu. En plus des groupes 4-O-methylglucuroniques, des unités arabinose sont également liées aux unités xylose par des liaisons α-1-2 et α-1-3, pour des ratios arabinose : xylose de l'ordre de 6—10 : 1, comme l'illustre le Tableau 5.

	Ratios Xylose : arabinose : acide glucuronique	Ramifications par molécule
Epicéa commun *(Picea abies)*	7,4 : 1 : 1,25	1,8
Gingko biloba	9 : 1 : 1,5	1,3
Mélèze de Sibérie *(Larix sibirica)*	10 : 1 : 3,9	-
Pin de Monterey *(Pinus radiata)*	5,3 : 1 : 0,9	0,7
Pin sylvestre *(Pinus sylvestris)*	11,6 : 1 : 3,7	-

Tableau 5 : Ratios xylose/ arabinose/acide glucuronique pour certains résineux [5]

3.3 Autres hémicelluloses

D'autres types d'hémicelluloses existent, mais ils sont présents en faible quantité, composant moins de 5% du bois [5], [7]. Les xyloglucanes entrent dans la composition des feuillus. Leur chaine principale est composée de glucose et de xylose, avec 75% de ces unités possédant des ramifications composées par des unités galactose, xylose ou arabinose. Les ramifications peuvent être constituées de deux ou trois unités.
Les arabinoxylanes peuvent être présents dans certains feuillus, et en grande quantité dans le mélèze et les plantes annuelles. Leur composition est similaire à celle des O-acetyl-4-O-méthylglucuronoxylanes, avec cependant une quantité d'unités arabinose plus importante.

3.4 Lignine

La lignine est le constituant du bois qui lui confère sa résistance, mais aussi sa couleur. Il s'agit d'un polymère phénolique amorphe et irrégulier, ayant un DP situé autour de 100 unités phénoliques [6], [8]. Il n'existe pas de structure propre à la lignine, mais trois unités de base, le guaiacylpropane, le p-hydroxyphénylpropane et le syringylpropane peuvent être définies (Figure 4, [5]).

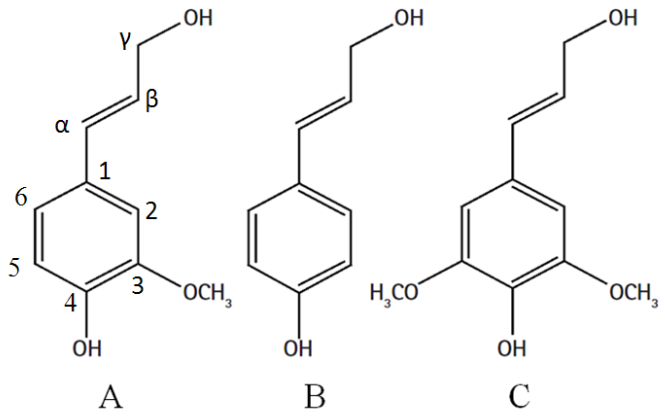


Figure 4 : Unités de base de la lignine (A : guaiacylpropane ; B : p-hydroxyphénylpropane ; C : syringylpropane) [6]

Les différences de compositions des lignines, selon les espèces, se traduisent par des différences de ratios entre ces trois unités. Ainsi, la lignine de résineux est composée en majorité d'unités guaiacylpropane. L'épicéa présente par exemple 95 unités guaiacylpropane pour un syringylpropane et 5 p-hydroxyphénylpropane. La répartition est de 86:2:13 pour le pin taeda [3]. La lignine de feuillu contient quant à elle une majorité d'unités syringylpropane.
La Figure 5 donne un aperçu d'une molécule de lignine de résineux et montre que les unités phénoliques sont liées majoritairement entre elles par des liaisons éther (généralement β-O-4) et dans, une moindre mesure, de liaisons carbone-carbone (5-5 et β-β pour les plus courantes) [5].

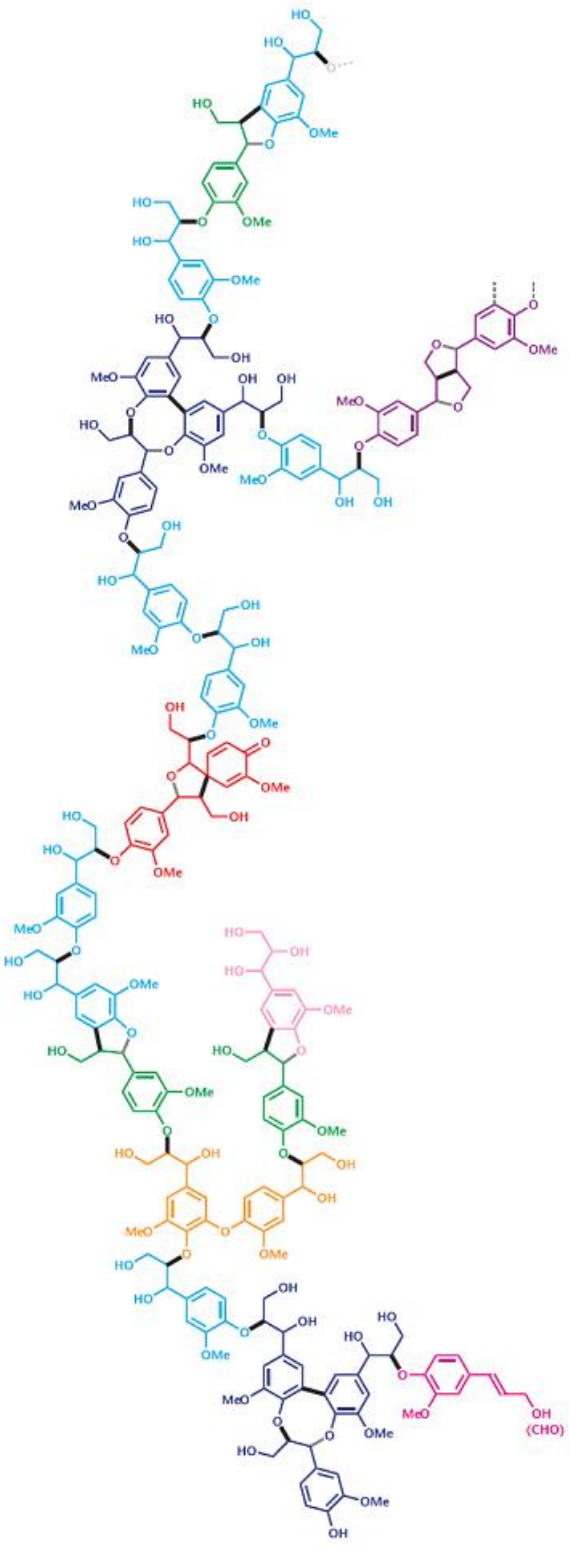


Figure 5 : Exemple de schéma structurel de lignine [9]

La lignine et les polysaccharides forment des liaisons appelées complexe ligno-saccharides (LCC pour *Lignin-Carbohydrate Complex*). Dans les faits, ces liaisons relient la lignine aux chaines hémicellulosiques, la cellulose n'étant pas ou peu concernée. Elles sont de type benzyle ether, benzyle ester ou phényle glycoside [10].

3.5 Extractibles

Les extractibles, aussi appelés extraits, sont, comme leur nom l'indique, les composés du bois pouvant être extraits à l'aide de différents solvants comme l'eau, l'acétone, l'éthanol ou le benzène. Leur teneur ne dépasse généralement pas 5% de la composition du bois [5]. Sous ce terme générique est regroupé un grand nombre de molécules. Les extractibles des résineux sont principalement composés de terpènes et terpénoïdes (d'où est extraite la térébenthine notamment), mais aussi d'acides gras, d'acides résiniques, de composés phénoliques et lignanes (composés constitués de deux unités phénoliques), des cires, des graisses et des alcools.
Les extractibles de feuillus sont semblables, avec une proportion plus faible en terpènes. Des tannins rentrent également dans leur composition [3], [5].

3.6 Composés inorganiques

Les composés inorganiques, aussi appelés cendres, représentent les résidus de la combustion du bois. Ils en composent moins de 1% [5] dans les zones tempérées (jusqu'à 5% dans certains bois tropicaux). Leur composition dépend principalement du sol sur lequel a poussé l'arbre. Il est toutefois possible de dégager certaines tendances : les cendres sont constituées en général de calcium, potassium, magnésium et manganèse, par ordre décroissant d'abondance. Il est également possible de trouver selon les arbres du sodium, de chlore, du potassium, de l'aluminium, du fer, du cuivre et/ou du zinc.

B. Concept de bioraffinerie

1 Définition

Le concept de bioraffinerie a été développé ces dernières années. Il s'agit d'une installation industrielle destinée à valoriser la biomasse dans son ensemble, en un même endroit et en une gamme de produits qui peut prendre la forme de produits chimiques, de carburants ou d'énergie [6]. Ce terme a été créé par analogie à la raffinerie pétrolière, qui valorise sous la forme d'une multitude de produits le pétrole brut. Cette désignation est d'autant plus vraie que l'un des enjeux du développement des bioraffineries est de produire des substituts aux dérivées pétroliers pour, à terme, les suppléer. Il existe une grande variété de produits pouvant être obtenus à partir de biomasse, qu'il est possible de classer en trois catégories, les matériaux, les biocarburants et les produits chimiques [11]. Les carburants peuvent être le biodiesel, le bioéthanol, le butanol ou même des hydrocarbures similaires à ceux obtenus par la pétrochimie. Les matériaux possibles sont par exemple les fibres cellulosiques, les dérivés de la cellulose, les nanocristaux de cellulose [12], les microfibrilles de celluloses [13] ou encore des polymères. En ce qui concerne les produits chimiques, le ministère de l'énergie américain, en collaboration avec le NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) a déterminé quinze molécules à produire prioritairement par la bioraffinerie. Ce *top ten* (Tableau 6), établi en 2004, a été sélectionné parmi 300 molécules pouvant être produites à partir de saccharides. Pour être sélectionnée, une molécule doit répondre aux critères suivants :

- Elle peut être produite selon un procédé connu, du moins en théorie
- Elle doit servir de précurseur à plusieurs sous-produits
- Elle, ou ses sous-produits, doivent concurrencer des dérivés pétroliers

- Le marché potentiel doit être important
- La recherche au sujet de cette molécule avance, ou elle est déjà produite industriellement

A titre d'exemple, la bioraffinerie française de Bazancourt-Pomacle produit de l'acide succinique à partir de biomasse depuis 2010, alors que ce composé est d'habitude majoritairement obtenu à partir de dérivé pétrolier [14].

Molécules sélectionnées
acides 1,4 succinique, fumarique et malique
Acide 2,5 furan dicarboxylique
Acide 3 hydroxypropionique
Acide aspartique
Acide glucarique
Acide glutamique
Acide lévulinique
3-hydroxybutyrolactone
Glycérol
Sorbitol
xylitol/arabinitol

Tableau 6 : Le *top ten* du DOE en 2004: quinze précurseurs à produire prioritairement à partir de biomasse, selon le NREL [15]

Cette liste a été mise à jour en 2010 par les mêmes auteurs [16]. Avec six années de recul, ils ont réévalué leurs critères et effectué le même travail, en tenant compte de la recherche effectuée depuis 2006 (Tableau 7). Cela a permis notamment d'éliminer les acides 1,4 succinique, fumarique et malique, qui n'ont pas fait l'objet de recherches intensives. *A contrario,* l'éthanol, vu alors comme un carburant, est intégré dans la liste, grâce à l'intérêt dont il fait l'objet en tant que précurseur de multiples produits comme par exemple l'éthylène, par déshydratation, ou l'acide acétique par oxydation [16]. Il présente également l'avantage d'être déjà produit à grande échelle. La présence de furanes, glycérol et acide lévulinique peut également être soulignée. Ces produits sont en effet synthétisés lors de la production d'éthanol hémicellulosique (cf. les parties B.3 et C ce chapitre).

Molécules sélectionnées
Ethanol
Furanes (furfural)
Glycérol et dérivés (HMF, FDCA)
Hydrocarbures (isopropène)
Acide lactique
Acide succinique
Acide (aldéhyde) 3 hydroxypropionique
Acide lévulinique
Sorbitol
xylitol

Tableau 7 : *Top te*n mis à jour en 2010 [16]

Ce *top ten* peut être discutable mais donne un aperçu des produits chimiques type qu'une bioraffinerie doit chercher à produire.

Deux types de bioraffineries sont généralement définis, qui se distinguent par leurs procédés : la plateforme thermochimique et la plateforme sucre [17], [18]. La première se caractérise par la déstructuration complète de la biomasse en composés de base (de type *syngas*) qui servent ensuite de précurseur à la synthèse de nouveaux produits. La seconde, également appelée plateforme biochimique, fractionne la biomasse pour en extraire ou utiliser directement les sucres qu'elle contient comme précurseurs pour la synthèse de nouveaux produits.

1.1 Plateforme thermochimique

Plusieurs procédés peuvent être utilisés dans le cadre d'une plateforme thermochimique : la combustion, la pyrolyse, la torréfaction et la gazéification. Les intrants peuvent être composés de biomasse lignocellulosique de base (bagasse, paille…) mais également de sous-produits comme la liqueur noire résultant du procédé Kraft, dont la gazéification semble prometteuse [19].

La combustion est utilisée principalement pour produire de l'énergie. La torréfaction et la pyrolyse sont généralement utilisées en prétraitement d'une gazéification. La torréfaction [20], [21] permet d'obtenir une biomasse plus facile à moudre (une biomasse composée de fines particules sphériques étant un prérequis à la gazéification), alors que la pyrolyse permet d'obtenir une bio-huile, qui peut être valorisée sous forme d'autres produits, ou gazéifiée [22].

La gazéification de biomasse donne deux phases : les gaz de synthèse (ou *syngas*), et une phase solide composée de « *char* » et de goudrons (Figure 6). Les ratios entre gaz de synthèse et goudrons, ainsi que leurs compositions, peuvent être ajustés en modifiant la température, la durée, le ratio d'oxygène introduit ou en utilisant des catalyseurs [23], [24].

Les gaz de synthèse, principalement composés de dihydrogène, de monoxyde de carbone et de dioxyde de carbone, peuvent être directement brulés dans une turbine afin de produire de l'énergie. Le dihydrogène peut également être utilisé comme source d'énergie (pile à combustible). Le monoxyde de carbone et le dihydrogène peuvent enfin servir de précurseurs

à d'autres produits, comme du méthanol [25], le dimethyl-ether, du méthane, de l'éthanol [26] ou des hydrocarbures via le procédé Fischer-Tropsch.

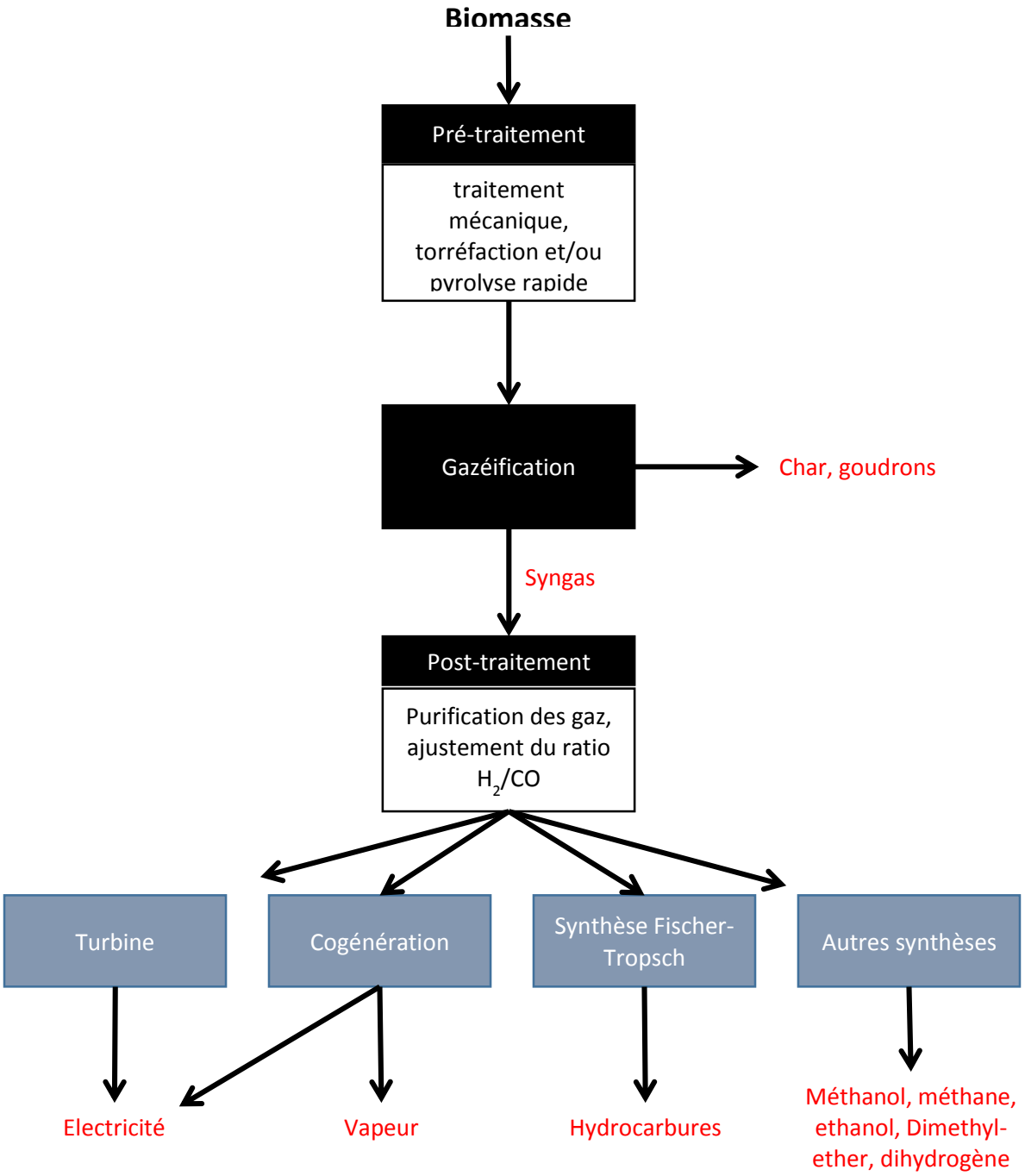


Figure 6 : Exemple de plateforme thermochimique: gazéification de la biomasse et les différentes possibilités offertes pour la valorisation des gaz de synthèse

1.2 Plateforme sucre

La plateforme sucre utilise des procédés permettant d'extraire les sucres contenus dans le bois (amidon, saccharose, cellulose et hémicelluloses) et de les valoriser. Ce procédé est également appelé plateforme biochimique car certains procédés de valorisation utilisent des

microorganismes pour effectuer des fermentations ou des hydrolyses enzymatique. C'est ce type de bioraffinerie qui fait l'objet de cette thèse.
Contrairement aux procédés thermochimiques, certains procédés de fractionnement de la biomasse végétale sont matures et utilisés à l'échelle industrielle. Les produits fabriqués en plus grande quantité sont les fibres cellulosiques (161 MT produites en 2012, incluant la pâte à papier de fibres vierges écrue et blanchie et la pâte à dissoudre) et deux biocarburants : l'éthanol, produit à partir de saccharose et d'amidon principalement (104 MT produites en 2012 [27]), et le biodiesel, conçu à partir d'oléagineux (19 MT produites en 2012 [28]).
La méthanisation, qui est une fermentation spécifique, est souvent employée pour dégrader la biomasse de déchets agricoles ainsi que dans les stations d'épuration. Elle permet de produire principalement du méthane et du dioxyde de carbone par une digestion anaérobie menée par plusieurs microorganismes travaillant en synergie.

2 De l'usine Kraft à la bioraffinerie

Bien que le concept de bioraffinerie n'ait été développé que récemment, l'utilisation et la valorisation de la biomasse sont quant à elles établies depuis bien longtemps. Ainsi, les usines de pâte chimiques appliquent d'ores et déjà le concept propre à la bioraffinerie en séparant les constituants de la biomasse et en les valorisant. Toutefois, elles ne valorisent pas la totalité de la biomasse, et les débouchés ne sont pas forcément optimaux.
Deux procédés dominent concernant la fabrication de fibres cellulosiques, le procédé kraft et le procédé au sulfite.

2.1 Procédé kraft

De nos jours, le procédé kraft, ou procédé au sulfate, représente 75% de la pâte vierge fabriquée dans le monde avec 127 000 kT produites en 2012, loin devant la pâte mécanique (20%) [29].
Le principe du procédé kraft a été breveté en 1884. Jusqu'à cette date, la production de pâte à papier chimique était effectuée avec de la soude. La soude était régénérée via la combustion de la liqueur de cuisson puis une caustification. Du carbonate de sodium (Na_2CO_3) était ajouté avant la caustification pour faire l'appoint. Afin de réduire les coûts, un certain Carl Dahl essaya de substituer le carbonate de sodium par du sulfate de sodium (Na_2SO_3). Du sulfure de sodium (Na_2S) était alors généré dans la liqueur de cuisson. Il observa alors que la pâte produite possédait de bien meilleures propriétés mécaniques. Le procédé kraft (qui signifie « solide » en suédois) était né. Il a cependant fallu attendre le développement et l'amélioration des techniques de blanchiment pour que ce procédé s'impose au détriment du procédé au sulfite.
Aujourd'hui, ce procédé ne se contente pas de produire des fibres cellulosiques, mais également d'autres produits issus du bois, comme le tall-oil et l'essence de térébenthine [6]. De plus, le procédé kraft est excédentaire en énergie dans les usines modernes. Il permet non seulement de subvenir aux besoins d'une usine de pâte pour la cuisson, la régénération des réactifs et le blanchiment, mais également de produire du papier, dans le cas des usines intégrées, ou de vendre l'électricité en surplus sur le réseau. La production de matériaux, de produits chimiques et d'énergie font d'une usine de pâte Kraft un exemple typique de bioraffinerie.
Le principe global de la fabrication de pâte chimique est d'isoler les fibres cellulosiques en les libérant de leur carcan de lignine. De plus, il est nécessaire de retirer la lignine incluse (en quantité importante) dans les fibres, tout en évitant de trop dégrader la cellulose. Pour cela, la lignine est donc solubilisée puis éliminée. Ainsi pour 100 kg de bois en début de cuisson, 40 à 50 kg de pâte sont obtenus après une cuisson kraft classique (rendement d'extraction).

2.1.1 Principe de la cuisson kraft

Comme exposé précédemment, le procédé kraft se distingue de la cuisson à la soude par l'utilisation de soude et de sulfure de sodium dans la liqueur d'extraction, appelée plus communément liqueur blanche. Les principaux paramètres d'une cuisson kraft sont :

- La teneur en alcali
- La sulphidité
- Le profil de température et la durée du traitement
- Le ratio liqueur-sur-bois (L/B)

Le teneur en alcali dépend des quantités de soude et de sulfure de sodium par rapport au bois. En effet, la réaction donnée par l'Equation 1, se déroulant quant du sulfure de sodium est placé dans l'eau, est totale, l'ion sulfure étant un alcali fort.

Equation 1

$$Na_2S + H_2O \rightarrow NaOH + NaSH$$

En papeterie, deux grandeurs sont utilisées pour définir l'alcali d'une liqueur. L'alcali actif (AA) détermine la quantité totale d'alcali (Equation 2) et l'alcali effectif (AE) désigne la quantité de soude totale en solution (Equation 3), calculé par rapport à l'Equation 1, en tenant compte des masses molaires de la soude (40 g/mol) et du sulfate de sodium (78 g/mol). Les AA et AE sont exprimés en gramme pour 100 g de bois.

Equation 2

$$\mathrm{AA} = \mathrm{NaOH} + \mathrm{Na_2S}$$

Equation 3

$$\mathrm{AE} = \mathrm{NaOH} + \frac{40}{78}\mathrm{Na_2S} \approx \mathrm{NaOH} + \frac{1}{2}\mathrm{Na_2S}$$

Une autre grandeur utilisée en papeterie est la sulphidité, définie par l'Equation 4.

Equation 4

$$\mathrm{S} = 100 \times \frac{\mathrm{Na_2S}}{\mathrm{NaOH} + \mathrm{Na_2S}}$$

Dans l'industrie, les quantités de NaOH utilisées sont de l'ordre de 15—18% par rapport au bois, quand celles de Na_2S sont de 4—6%, soit des AA de 19—24%, des AE de 17—21% et enfin une sulphidité de 15—30%.

Une température minimale de 140°C est requise pour permettre les réactions de délignification. Les températures typiquement utilisées sont de l'ordre de 150—170°C. Les temps de cuisson varient en fonction de la matière première (les résineux demandent plus de temps, du fait de leur teneur plus importante en lignine), et du devenir de la pâte. Une pâte destinée à faire de l'emballage demande une délignification moins importante qu'une pâte destinée à être blanchie

par exemple. La cuisson dure généralement entre 2 et 4 heures, en tenant compte du temps de montée en température. Une grandeur, appelée facteur H, a été instaurée pour unir le temps de cuisson et la température et définir ainsi une sévérité de cuisson. Elle a été définie par Vroom en 1957 selon l'Equation 5 [30], à partir d'une énergie d'activation de la réaction de délignification de 134 kJ/mol. Cette grandeur permet de comparer les cuissons à des températures et des durées différentes entre elles.

Equation 5

$$\text{Facteur H} = \int_0^t e^{43{,}181 - \frac{16113}{T(t)}} dt$$

T représente la température en kelvin, et t le temps en heures

2.1.2 Réactions sur la lignine

Durant la cuisson, la lignine subit des attaques nucléophiles de la part des ions OH^- et HS^-, ces derniers étant plus nucléophiles, ils sont plus efficaces.
Au-delà de 140°C, les liaisons éther (β-0-4 et α-O-4), qui représentent la majorité des liaisons entre composés phénoliques dans la lignine (cf. partie A.3.4 de ce chapitre), sont clivées par ces attaques. Il en résulte des composés phénoliques de faible poids moléculaire qui sont solubilisés dans la liqueur.

Les composés phénoliques peuvent cependant se condenser avec d'autres unités phénoliques, diminuant ainsi leur solubilité. Une condensation de ces composés sur les fibres peut même être observée. Ces réactions sont toutefois limitées par la présence des ions HS^-. De plus, grâce à leur fort pouvoir nucléophile, ces ions entrent en compétition avec ces composés phénoliques et limitent les réactions de condensation. La lignine extraite contient donc du soufre, ce qui peut s'avérer problématique pour une valorisation ultérieure qui utiliserait des procédés catalytiques (gazéification suivie de réactions de Fischer-Tropsch par exemple).

Des équations semi-empiriques ont été déterminées pour évaluer la délignification lors de la cuisson. Celle-ci est divisée en trois phases. La phase initiale n'est pas très efficace, ayant lieu à basse température. La majeure partie de la lignine est retirée pendant la seconde phase, dite principale. Enfin, la dernière phase concerne la lignine résiduelle, qui demande beaucoup d'énergie pour être extraite. Il est déconseillé de s'acharner à l'extraire pendant la cuisson kraft, au risque de dégrader de manière importante la cellulose.
Les cinétiques de délignification des trois phases sont régies par les Equations 6, 7 et 8 [31], dans l'ordre chronologique. Dans ces équations, L désigne la quantité de lignine présente dans le bois, R la constante universelle des gaz parfaits, T la température en kelvin, t le temps de réaction et A une constante qui dépend des caractéristiques du bois utilisé.

Equation 6

$$-\frac{dL}{dt} = A\, e^{\frac{-60}{RT}} L$$

Equation 7

$$-\frac{dL}{dt} = A\, e^{\frac{-150}{RT}} \times [OH^-]^{0.8} \times [HS^-]^{0.4} \times L$$

Equation 8

$$-\frac{dL}{dt} = A\, e^{\frac{-120}{RT}} \times [OH^-]^{0.6} \times L$$

La cinétique de la phase initiale ne dépend pas des réactifs. L'énergie d'activation de 60 kJ/mol explique que cette phase s'initie à faible température. En ce qui concerne la phase principale, la concentration en ions hydroxydes est prédominante comparée à celle des ions HS^-. Enfin, les coefficients déterminés pour la phase finale, plus faibles, traduisent bien la difficulté à extraire la lignine à ce stade.

La teneur en lignine résiduelle après une cuisson kraft est donnée par l'indice kappa (norme TAPPI T 236 cm-85). Cet indice est couramment utilisé dans l'industrie. Pour remonter à la teneur en lignine, il faut multiplier cet indice kappa par un facteur 0,15. Cet indice n'est qu'indicatif, certains facteurs pouvant fausser la mesure, comme la présence d'acides hexenuroniques.

2.1.3 Réactions avec les polysaccharides

La cuisson kraft a également un impact négatif sur les polysaccharides, en particulier sur leurs degrés de polymérisation.
La première réaction observée, même à basse température, est la désacétylation des hémicelluloses.

Ensuite, à partir d'environ 80°C, une réaction appelée peeling a lieu. Elle concerne l'extrémité réductrice des hémicelluloses et de la cellulose, formée d'un aldéhyde. Cet aldéhyde subit une réaction de substitution nucléophile, aboutissant à la perte d'une unité du polymère, transformée en acide organique. Une unité réductrice est de nouveau créée après cette réaction, et peut donc subir une nouvelle fois le peeling. Cependant, une réaction concurrente moins probable (elle se produit 1 fois sur 50 environ) peut engendrer un acide organique au lieu d'un aldéhyde en bout de chaîne, stoppant définitivement le peeling. La présence d'une ramification sur le carbone C2 stoppe également le peeling, ce qui préserve notamment les xylanes. Ces derniers sont également protégés en partie du fait qu'ils peuvent posséder comme extrémité réductrice un acide galacturonique interdisant tout peeling [3]. Hormis les xylanes, les polysaccharides perdent entre 30 et 100 unités, ce qui est négligeable pour la cellulose (DP de 10 000) mais problématique pour les galactoglucomannanes (DP maximum de 200). Le peeling engendre également une surconsommation de réactifs.

Au-delà de 130°C a lieu une autre réaction, l'hydrolyse alcaline des polysaccharides. Certaines liaisons β-1,4 de la cellulose et des hémicelluloses sont rompues, diminuant drastiquement les degrés de polymérisations et créant de nouvelles extrémités réductrices sensibles au peeling. Le DP de la cellulose passe ainsi de 10 000 à environ 1500 [5]. Les xylanes, malgré leur résistance au peeling, voient leurs DP chuter pour être compris entre 5 et 10. Les plus petits oligomères se trouvant solubilisés dans la liqueur, ils n'entrent pas dans la composition de la pâte. En ce qui concerne les GGM, peu d'entre eux réchappent à la cuisson kraft. Ils sont majoritairement transformés en acides organiques, solubilisés dans la liqueur, et envoyés à la chaudière. Il est

estimé qu'environ 50% des xylanes et 25% des GGM sont encore présents dans la pâte après le procédé kraft [32].

Une équation cinétique empirique a également été déterminée pour la dégradation des polysaccharides (Equation 9, [33]). Elle est basée sur une énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse de 180 kJ/mol.

Equation 9

$$-\frac{dC}{dt} = k \times [OH^-]$$

C représente le taux de dépolymérisation de la cellulose

Comparer cette réaction à celles concernant la délignification permet de tirer quelques enseignements sur le procédé kraft. La concentration en HS^- n'intervenant pas dans l'hydrolyse des polysaccharides, il est ainsi conseillé d'en mettre en excès pour favoriser la délignification, et de limiter la concentration en OH^- au strict minimum. De même, l'énergie d'activation de l'hydrolyse étant plus élevée que celle de délignification, il est déconseillé d'utiliser des températures trop élevées, afin de privilégier la réaction de délignification, et non celle d'hydrolyse.

L'avantage conféré par la présence d'ions HS^- pendant la cuisson kraft est ainsi mis en évidence. Ceux-ci permettent non seulement une meilleure délignification, mais limitent aussi la condensation de la lignine. Une même délignification est donc atteinte plus rapidement, ce qui limite la dégradation de la cellulose.

2.1.4 Régénération

La présentation du procédé kraft ne saurait être complète sans évoquer la régénération des réactifs. Celle-ci est résumée sur la Figure 7. Après la cuisson, les fibres sont séparées de la liqueur noire par filtration puis lavées. La liqueur noire contient alors principalement :

- De la soude en très faible quantité
- Des composés phénoliques résultant de la délignification
- Des acides organiques provenant du peeling
- Du Na_2S (environ 50% de la quantité initiale car utilisé en excès)
- Du $Na_2S_2O_3$

Une partie de cette liqueur noire est envoyée en amont du procédé, pour imprégner les copeaux de bois. L'objectif est d'éviter la perte d'une partie des ions HS^- présents dans la liqueur noire avant même le début de la délignification. En effet, ces ions viennent se fixer sur les extrémités réductrices des polysaccharides, et le pouvoir de délignification de la liqueur blanche en est réduit. La liqueur noire dont sont imprégnés les copeaux contient encore en quantité non négligeable des ions HS^- qui se fixent sur les polysaccharides. L'alcali de la liqueur blanche est ainsi préservé.
Le reste de la liqueur noire est concentré par évaporation pour atteindre une siccité de 70 à 80%, puis est envoyé vers la chaudière. L'appoint en produits chimiques, pour compenser les pertes dues aux réactions annexes, est effectué à cet endroit à l'aide de Na_2SO_4. Environ 10 kg de produit sont ajoutés par tonne de bois.
Pendant la combustion de la liqueur noire, le sulfure de sodium est régénéré à partir de Na_2S_2 et de $Na_2S_2O_3$. Du carbonate de sodium (Na_2CO_3) est aussi généré. La liqueur obtenue, appelée

liqueur verte du fait de sa couleur, est donc composée de Na_2S et de Na_2CO_3. Par ailleurs, la combustion de la liqueur noire permet de subvenir aux besoins en électricité et énergie thermique de l'ensemble du procédé.
La régénération de la soude se fait par caustification. De la chaux vive (CaO) est injectée dans la liqueur verte. Elle réagit tout d'abord avec l'eau pour former de la chaux éteinte ($Ca(OH)_2$) selon l'Equation 10. Cette chaux éteinte réagit avec le carbonate de sodium pour former de la soude et du carbonate de calcium ($CaCO_3$) selon l'Equation 11.
Le carbonate de calcium précipite en milieu alcalin et peut donc être soustrait de la liqueur. Il est envoyé dans une autre boucle de régénération pour former de la chaux vive. Celle-ci est formée selon la réaction de l'Equation 12, qui a lieu à une température supérieure à 1 000°C, dans un four à chaux.
La liqueur blanche a été régénérée et peut être de nouveau utilisée pour une cuisson kraft.

Equation 10

$$CaO + H_2O \rightarrow Ca(OH)_2$$

Equation 11

$$Ca(OH)_2 + Na_2CO_3 \rightarrow 2NaOH + CaCO_3$$

Equation 12

$$CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2$$

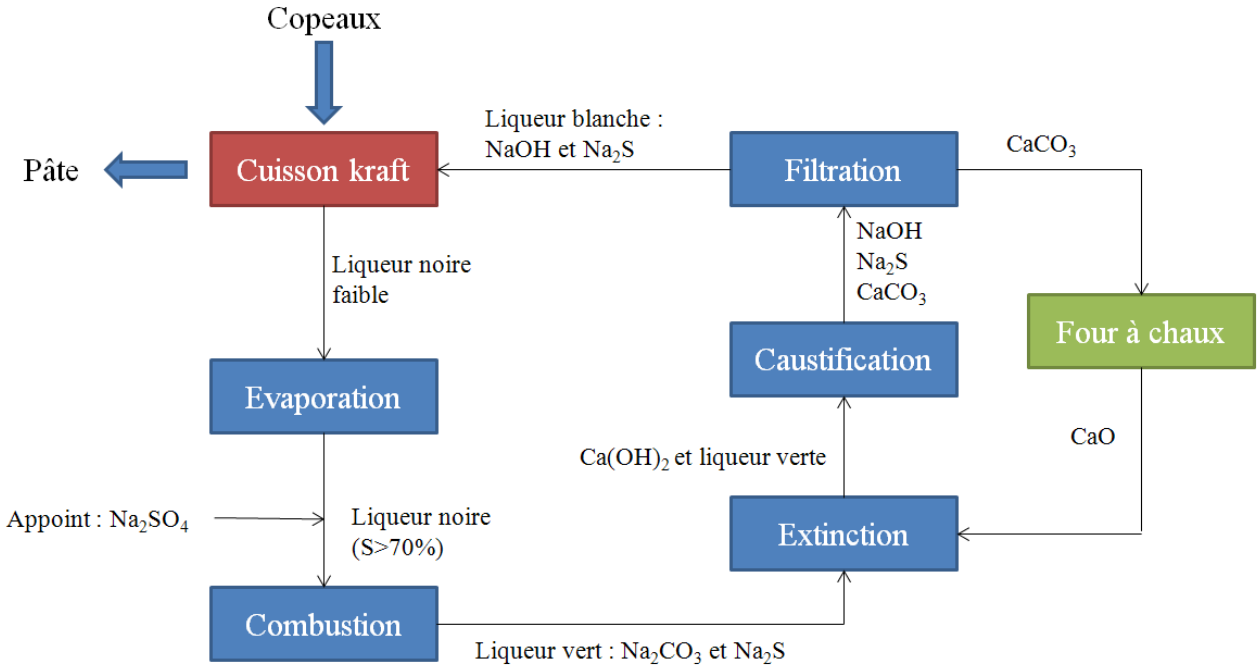


Figure 7 : Schéma simplifié du procédé de régénération de de la liqueur noire après une cuisson kraft

2.1.5 Fin de la délignification et blanchiment

A la fin du procédé kraft, seule la lignine résiduelle reste présente dans le bois (2 à 5% de la pâte). Alors que la lignine est en grande partie responsable de la coloration du bois, la pâte obtenue après cuisson est paradoxalement plus colorée [3]. Cela vient du fait que les composés phénoliques résiduels peuvent subir une oxydation les transformant en quinone, composé beaucoup plus coloré. S'il est nécessaire d'obtenir une pâte blanche, des traitements de blanchiment doivent être appliqués, qui achèvent la délignification tout en s'attaquant aux chromophores (composés colorés) présents dans la pâte [5].
Différents produits oxydants sont utilisés pour blanchir les pâtes, le chlore (stade C), le dioxyde de chlore (stade D), l'oxygène (stade O), le peroxyde d'hydrogène (stade P) ou encore l'ozone (stade Z). L'utilisation de la soude permet d'extraire la lignine oxydée (stade E). Un stade de chélation (Q) est généralement nécessaire pour extraire les ions métalliques présents dans la pâte. Dans certains cas, un stade acide (A) est utilisé pendant le blanchiment de bois de feuillu afin d'éliminer les acides hexenuroniques produits pendant la cuisson kraft, et consommateurs de produits de blanchiment. Ces différents stades sont appliqués en séquence sur la pâte, pour extraire la lignine résiduelle, puis s'attaquer aux derniers composés chromophores. Des séquences de type ODEDED sont couramment utilisées. Ce sont des séquences appelée séquences ECF (*Elemental Chlorine Free*). Des séquences n'utilisant aucun composé chloré, appelées TCF (*Totally Chlorine Free*) ont également été développées.

2.2 Cuisson au sulfite

La cuisson au sulfite est aujourd'hui minoritaire, mais il est intéressant d'en parler dans le cadre de cette thèse car elle permet de produire industriellement de l'éthanol de seconde génération, comme sous-produit.
La cuisson au sulfite, mise au point en 1857 par Benjamin Tighman, a connu son heure de gloire pendant le début du XXème siècle car elle permettait de produire du papier relativement blanc. Cependant, le développement des techniques de blanchiment à partir des années 1930 a permis au procédé kraft de s'imposer. Aujourd'hui, seuls 3% (soit 4 200 kT en 2012 [29]) de la production mondiale de pâte chimique est produite selon ce procédé. Il permet de concevoir de la pâte à dissoudre, cellulose pure utilisée dans l'industrie chimique et pour la fabrication de fibres textiles.

La délignification s'effectue ici en milieu acide, Contrairement au nom employé, le procédé utilise l'ion bisulfite HSO_3^- et non l'ion sulfite SO_3^{2-}. La liqueur blanche est formée par réaction d'un alcali et de dioxyde de soufre (SO_2) en excès et est dotée d'un pH compris entre 1,5 et 2,5. Pendant la cuisson au sulfite, la lignine est rendue soluble après greffage des ions bisulfites (sulfonation). Son hydrolyse est marginale, mais permet néanmoins de faciliter sa solubilisation. En milieu acide, les hémicelluloses sont hydrolysées, la majeure partie est extraite sous forme de monomères. La cellulose subit également l'hydrolyse, mais est protégée par sa structure cristalline. Cependant, les fibres sont sérieusement endommagées, ce qui explique que ce procédé n'est plus utilisé pour fabriquer du papier. Les monosaccharides présents dans la liqueur peuvent être valorisés sous différentes formes, comme produire de l'éthanol en les fermentant [34]. Ainsi, les usines Tembec (à Témiscaming au Canada), Dömsjö en Suède et Borregaard en Norvège produisent respectivement 12 millions, 15 millions et 20 millions de litres d'éthanol par an.

2.3 Adapter une usine kraft à la bioraffinerie

Il a été présenté qu'une usine kraft est déjà en soit une bioraffinerie. Cependant, le concept de bioraffineries stipule que la biomasse doit être valorisée de manière optimale. Or ce n'est pas

encore le cas. En effet, seules les fibres cellulosiques ainsi que l'essence de térébenthine et le tall-oil obtenus à partir des extractibles sont valorisés. Mais la valorisation peut aller encore plus loin. Certains imaginent exploiter d'autres extractibles pour en faire des parfums, des arômes ou des additifs alimentaires [35], [36]. Le cellulose, ou tout du moins une partie, pourrait être purifiée et utilisée pour la conception de nano-fibrilles de cellulose (NFC) ou de microfibrilles de celluloses (MFC) [12], [37]. Par ailleurs, la lignine est brûlée à la chaudière de régénération, subvenant à l'ensemble des besoins énergétiques de l'usine. Il pourrait cependant être envisageable de traiter une partie de cette lignine pour concevoir des produits à plus forte valeur ajoutée, soit en l'extrayant de la liqueur noire, soit en gazéifiant cette liqueur noire ([19], cf. la partie B.1.1 de ce chapitre).
Le troisième constituant du bois, les hémicelluloses, sont mal valorisées dans le procédé kraft. Celles-ci sont en partie solubilisées, dégradées et brûlées à la chaudière. Or, leur pouvoir calorifique, évalué à 13,6 MJ/kg, est relativement faible comparé à celui de la lignine (27 MJ/kg) [38], il pourrait donc être envisagé de mieux les exploiter. Ceci étant d'autant plus vrai pour un procédé utilisant du résineux, dont les GGM sont presque entièrement perdus pendant le procédé kraft. Ainsi, les hémicelluloses représentent un immense potentiel à valoriser. Etant composées de saccharides, elles font des candidates idéales pour synthétiser les molécules présentes dans le *top ten* vu ci-dessus [16]. Elles pourraient entre autres servir à faire du bioéthanol par fermentation [7]. Un exemple d'un tel procédé est présenté Figure 8.

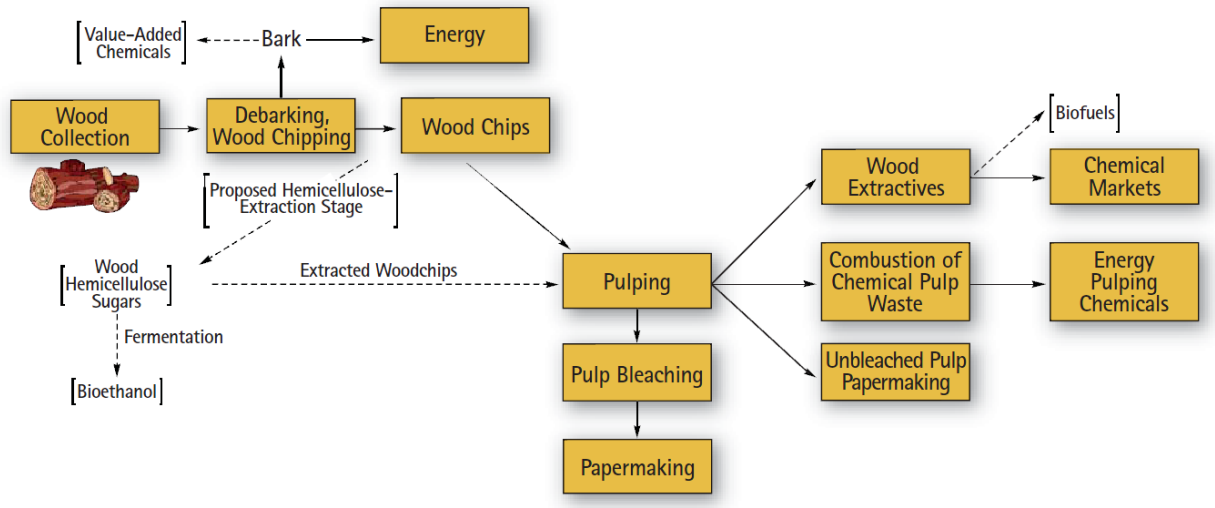


Figure 8 : Schéma d'une bioraffinerie produisant de la cellulose et du bioéthanol selon Ragauskas et al. [6]

Bien sûr, il serait parfaitement envisageable de monter de toutes pièces une bioraffinerie plutôt que de modifier une usine de pâte. Cependant, ces dernières présentent des avantages indéniables puisqu'environ 50 % du matériel nécessaire à une bioraffinerie est déjà sur place [11], que ce soit la station d'épuration pour le traitement des effluents, la chaudière ou encore le matériel permettant de conditionner la biomasse. Une usine de pâte kraft possède déjà son réseau d'approvisionnement en bois, les infrastructures, ainsi que le savoir-faire relatif à la transformation du bois.
De plus, les usines de pâte dans les pays européens et d'Amérique de Nord pâtissent de plus en plus de la concurrence des pays asiatiques ou d'Amérique du Sud. Ces derniers profitent globalement d'un coût des matières premières beaucoup plus compétitif, mais également d'usines plus modernes, utilisant les dernières technologies et des échelles de production plus importantes [38]. Pour rester compétitif, pour continuer à exister, il est crucial pour les

entreprises européennes et nord-américaines de développer des nouveaux produits à forte valeur ajoutée et de valoriser l'ensemble de leur matière première. La valorisation des hémicelluloses en amont du procédé pourrait également permettre une augmentation de la production de pâte d'une usine. En effet, le réacteur de cuisson (lessiveur) et la chaudière de régénération représentent souvent les goulots d'étranglement de la production d'une usine, d'autant plus qu'augmenter leurs capacités demande de grands investissements. La production de pâte est donc limitée par la quantité de bois et de liqueur blanche admissible par le lessiveur et/ou par la quantité de liqueur noire que peut accepter la chaudière [18]. En cas d'extraction des hémicelluloses avant le procédé, celles-ci ne passeraient plus dans le lessiveur, ni dans la chaudière via la liqueur noire. La production en fibres de l'usine de pâte pourrait ainsi augmenter jusqu'à 22% [39].

La mise au point d'un procédé permettant de produire de l'éthanol à partir des GGM d'une usine kraft utilisant du résineux est précisément le sujet de cette thèse. La première étape est l'extraction des hémicelluloses en amont de la cuisson kraft.

3 Extraction des hémicelluloses

Plusieurs procédés permettant d'extraire les hémicelluloses existent : des traitements acides, comme l'autohydrolyse et l'hydrolyse acide, ou alcalins. L'explosion à la vapeur, qui peut être catalysée, est un autre prétraitement possible déstructurant la biomasse. L'hydrolyse enzymatique sera également évoquée, même si son application aux hémicelluloses n'est pas encore au point.

3.1 Autohydrolyse et hydrolyse acide

Comme présenté précédemment, les polysaccharides sont composés de monomères liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Celles-ci peuvent être aisément hydrolysées, notamment en présence d'acide, qui est un catalyseur de cette réaction (Figure 9). Le caractère cristallin de la cellulose la prémunit cependant de ce type de dégradation, qui s'applique en premier lieu aux hémicelluloses.

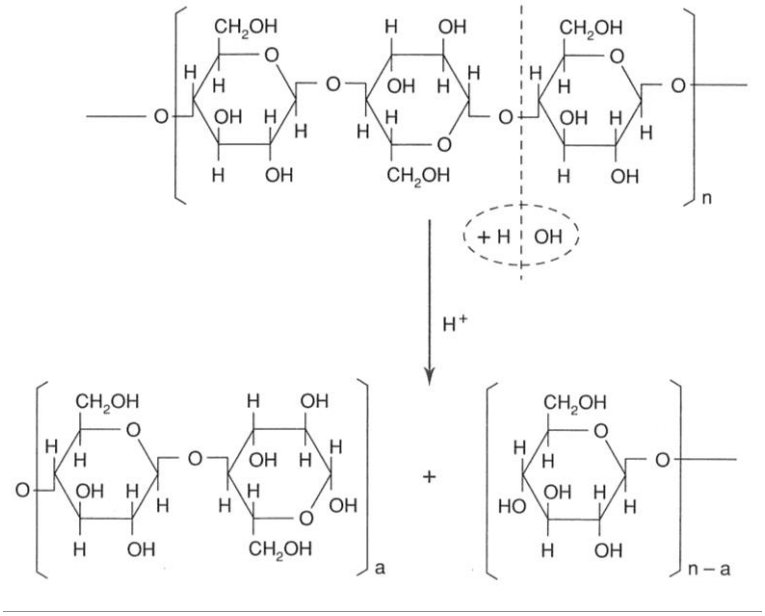


Figure 9 : Mécanisme de l'hydrolyse de la cellulose [32]

Si des copeaux de bois sont placés dans de l'eau chaude, une diminution du pH est observée, due à la libération sous forme d'acide acétique des groupes acétyles portés par certaines hémicelluloses. La réaction d'hydrolyse peut donc s'amorcer, sans autre ajout de réactifs. Ce traitement est alors appelé une autohydrolyse. A partir d'un certain degré de polymérisation, les hémicelluloses deviennent solubles et peuvent donc être extraites par simple séparation entre la phase solide et la phase liquide. Par exemple, la cellulose commence à devenir soluble en dessous d'un DP de 7 [3]. L'extraction des hémicelluloses peut cependant être amplifiée par l'ajout d'un acide minéral. Les autres paramètres d'hydrolyse sont la température, la durée du traitement et le ratio entre la quantité de liqueur et la quantité de matière solide (ratio liqueur sur bois, L/B).
Par analogie au facteur H utilisé pour quantifier la sévérité d'une cuisson kraft, le facteur P (pour *Prehydrolysis*) a été défini pour l'hydrolyse des hémicelluloses (Equation 13, [3]). Il prend en considération une énergie d'activation de 126,5 kJ/mol, qui est attribuée à la réaction d'hydrolyse des xylanes.

Equation 13

$$\text{Facteur P} = \int_0^t e^{40{,}48-\frac{15106}{T(t)}}\,dt$$

T représente la température en kelvin, et t le temps en heures

L'énergie d'activation de l'hydrolyse des GGM est quant à elle plus proche de celle de la délignification (134 kJ/mol). Il est donc plus juste d'utiliser le facteur H, plutôt que le facteur P, quand il s'agit de l'extraction de ce type d'hémicelluloses [40].
Une autre grandeur peut être utilisée, aussi bien pour l'autohydrolyse que pour l'hydrolyse acide, le facteur combiné de sévérité, CS (pour *Combined Severity*) [41], [43]. Il est défini par les Equations 14 et 15.

Equation 14

$$CS = \log R_0 - pH$$

pH correspond au pH final de l'extraction

Equation 15

$$R_0 = t \times e^{\frac{T-100}{14,75}}$$

Avec T la température en °C et t le temps en minutes

En fonction de la sévérité du traitement, le degré de polymérisation des hémicelluloses diminue jusqu'à obtenir des monomères. D'autres réactions entrent alors en jeux. Les monomères peuvent subir des réactions de déshydratation, entraînant l'apparition de furfural et de HMF à partir de pentoses et d'hexoses respectivement. Ces sous-produits peuvent eux-mêmes subir une dégradation ultérieure, et être transformés en acides formique, lévulinique,…[3], [44], [45] (Figure 10). Les pentoses sont affectés plus facilement que les hexoses [46].
Ces réactions sont à minimiser dans le cadre de cette thèse pour deux raisons : ces produits ne sont pas fermentescibles en éthanol et ils sont susceptibles d'inhiber les microorganismes fermentaires, réduisant les rendements de production d'éthanol (cf. la partie C.2.2 de ce chapitre). Il faut toutefois noter que l'ensemble de ces produits de dégradation ont leur place dans le *top ten* des molécules d'avenir et que leur extraction et valorisation pourrait être très rentable. Le HMF et le furfural sont les produits de dégradation les plus fréquents, mais les sucres peuvent également être transformés en d'autres composés aromatiques après déshydratation [5].

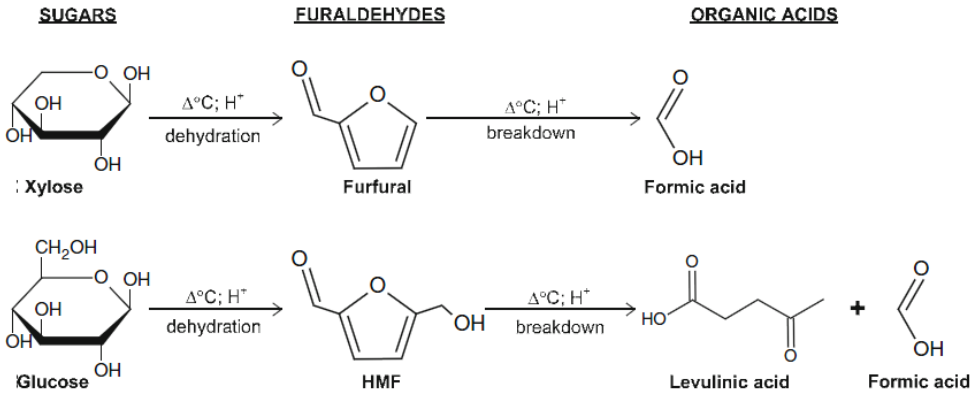


Figure 10 : Réactions successives de dégradation du xylose (réactions similaires pour l'arabinose) et du glucose (réactions similaires pour le mannose et la galactose) [47]

La lignine est elle aussi affectée dans ces conditions, subissant une hydrolyse acide conduisant à la solubilisation de petits oligomères de lignine [5]. Si les conditions sont trop sévères, la lignine peut également subir des réactions de condensation [3]. Par ailleurs, même si la quantité de lignine dissoute n'est pas très importante, elle peut avoir des effets non négligeables dans la suite du procédé. En effet, en cas d'hydrolyse secondaire enzymatique, ils peuvent réduire l'efficacité des enzymes [48]. Ils sont surtout, au même titre que le furfural et le HMF, considérés comme des inhibiteurs de fermentation.

3.1.1 Autohydrolyse

3.1.1.1 Composition de l'hydrolysat

Une autohydrolyse peut être menée à des températures modérées pour des temps relativement longs (150 à 190°C pour 1 à 2 h) ou à des températures élevées (200 à 230°C) pendant quelques minutes [7], [49].
Comme le sous-entend l'usage des facteurs P ou CS, la température et la durée du traitement sont intimement liées. En effet, comme l'illustre les Figure 11 concernant du bois de résineux et 12 pour du bois de feuillu, une quantité donnée de saccharides solubilisés peut être atteinte avec plus ou moins de temps selon la température. Le choix de la durée est donc primordiale, au-delà d'une certaine limite, la dégradation des saccharides prend le pas sur l'extraction, entraînant ainsi une diminution de la concentration en sucres (extraction menée à 180°C).

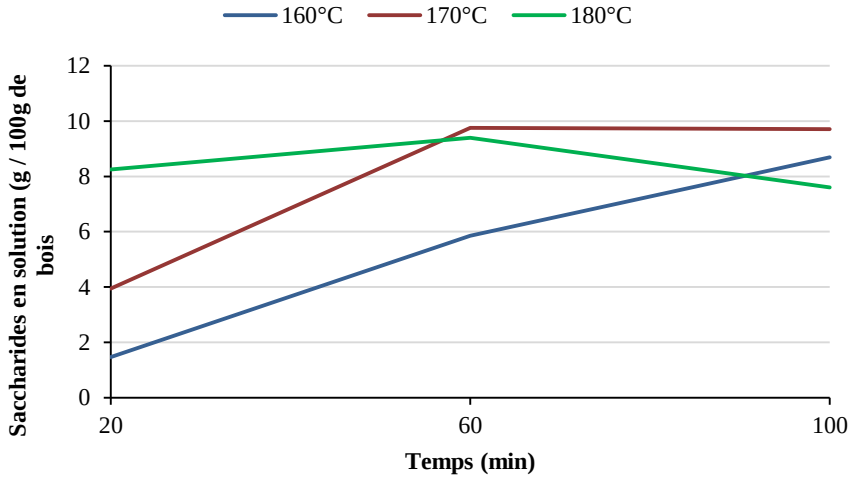


Figure 11 : Saccharides mesurés en solution après une autohydrolyse de bois d'épicéa (adapté de [50])

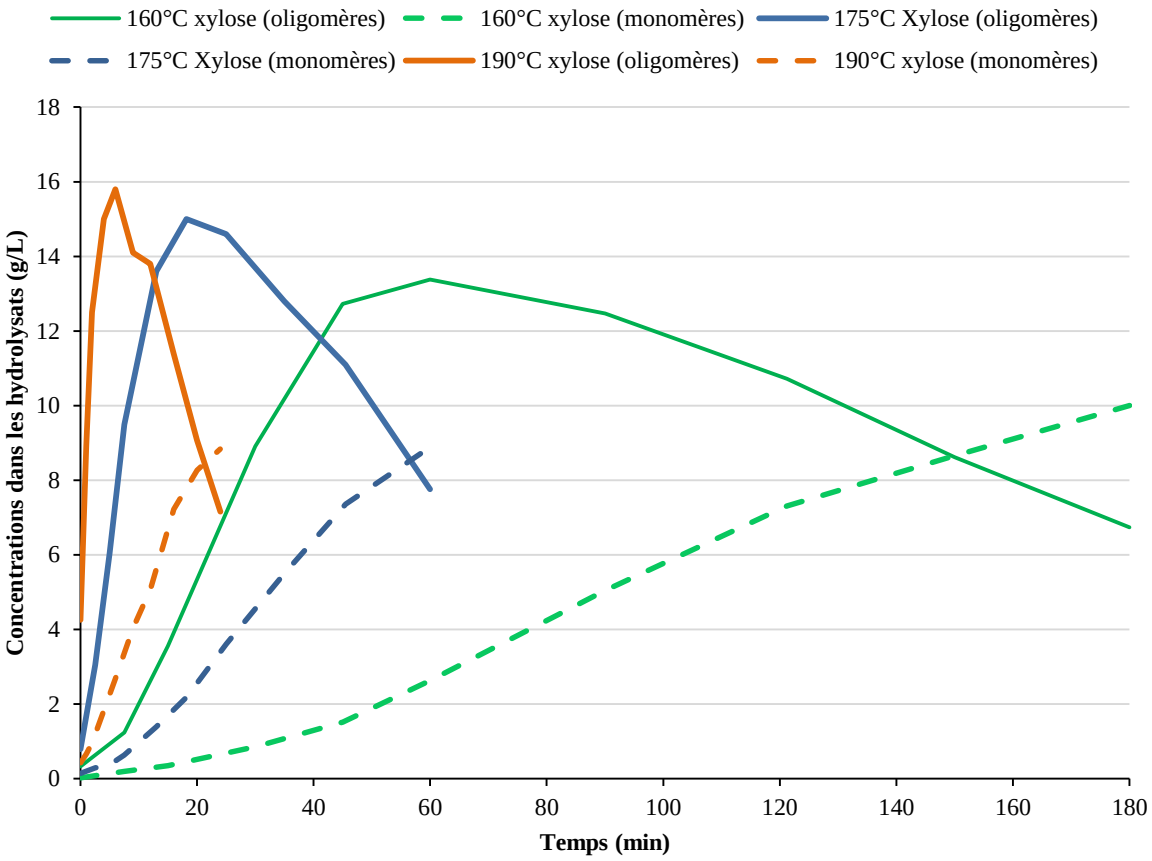


Figure 12 : Concentrations en xylose (oligomères et monomères) dans les hydrolysats suite à des autohydrolyses d'eucalyptus effectuées entre 160 et 190 °C à un ratio L/B de 8 (adapté de [51])

La quantité de matière solide extraite est d'environ 20% au maximum (Figure 13) à 150 °C après plus de 8 heures mais peut parfois dépasser 25% [51]. Les pentoses sont extraits plus rapidement. Ainsi, la quantité de xyloses de feuillus extraite est plus importante que celle de mannanes (Figure 14). Il est très difficile d'extraire la totalité des hémicelluloses avec une autohydrolyse, la quantité de saccharides extraite, hors glucose, est de 70% [7], [52] pour les conditions les plus sévères.

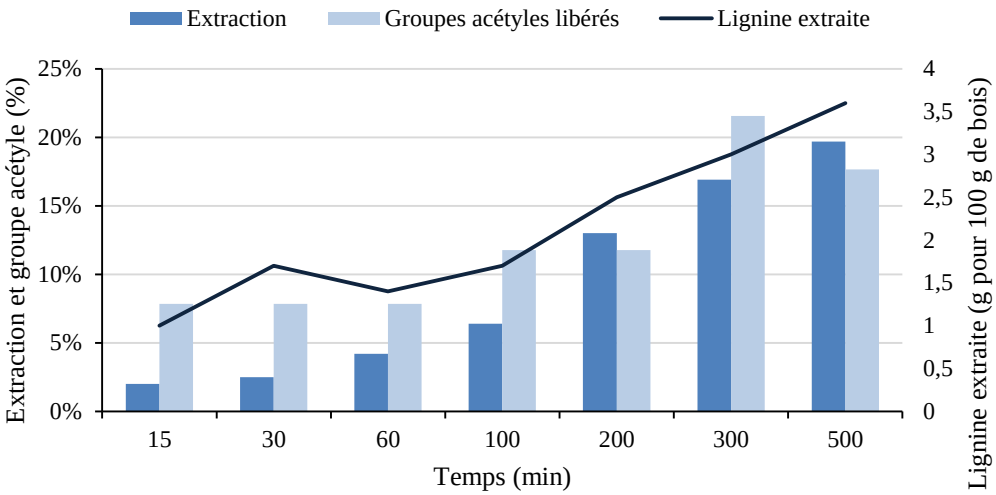


Figure 13 : Quantité de matière solide extraite, % de groupes acétyles libérés et lignine extraite du bois. Autohydrolyse de feuillus mixtes ; L/B=3,7 ; T=150°C (adapté de [52])

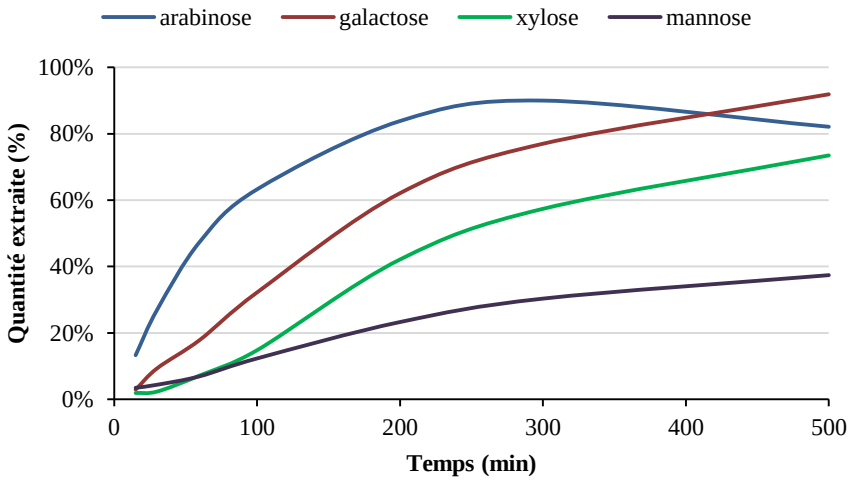


Figure 14 : Quantité de saccharides extraite (% par rapport à la teneur dans le bois, calculé par rapport aux saccharides en solution). Autohydrolyse de feuillus mixtes ; L/B=3,7 ; T=150°C (adapté de [52])

Le taux de monomères parmi les saccharides extrait est une donnée importante, sachant que seuls ces derniers peuvent être fermentés directement. Il est difficile d'obtenir un taux de monomères supérieur à 60—70% pour les hexoses (Figure 15, et [52]), ce qui signifie qu'un traitement subsidiaire est nécessaire pour parfaire l'hydrolyse. Cette post-hydrolyse, effectuée après séparation de l'hydrolysat et des copeaux, a l'avantage de n'avoir aucune influence sur la qualité des fibres et de la cellulose.
Parallèlement, la dégradation des saccharides est plus que modique, avec une concentration en furfural de 0,7 g/L au plus à 150 °C [52] ou 2 g/L à 200 °C [53].

La quantité de groupes acétyles libérée est relativement faible. Ainsi, après une autohydrolyse de 500 min à 150°C, seuls 30 % de ces groupes sont mesurés en solution (Figure 13). La proportion de lignine extraite observée dans l'hydrolysat est elle aussi de modérée : seulement 3,6 g pour 100 g de bois, sachant que le bois contient 3,2 g de lignine soluble dans l'acide. La

lignine non soluble (lignine Klason) hydrolysée est donc très faible [53]. Du reste, la mesure de la lignine présente dans les copeaux montre une variation peu significative après des autohydrolyses effectuées selon plusieurs sévérités (Figure 16).

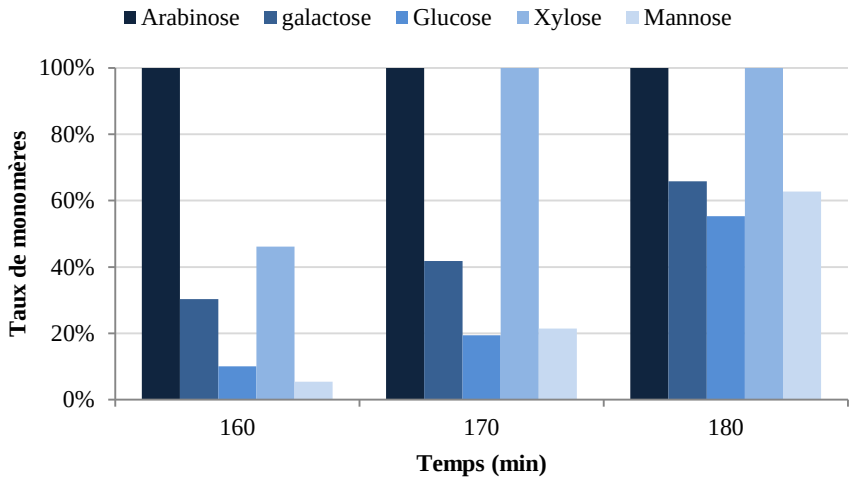


Figure 15 : Taux de monomères obtenus selon la température après une autohydrolyse de bois d'épicéa pendant 100 min (adapté de [50])

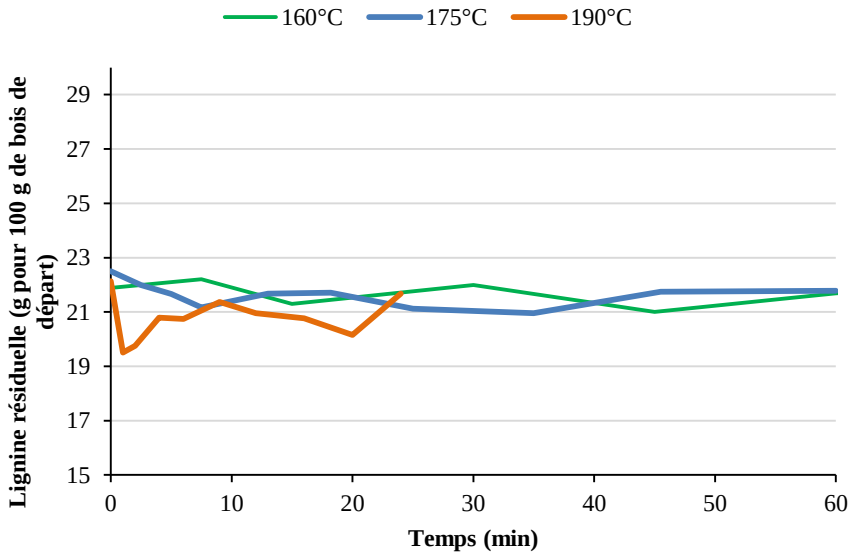


Figure 16 : Quantité de lignine présente dans les copeaux par rapport au bois de départ, pour des autohydrolyses de copeaux d'eucalyptus à un ratio L/B de 8 (adapté de [51])

Certaines études ont été menées pour évaluer l'influence de la taille des particules de biomasse sur la préhydrolyse. Une taille plus petite permet d'extraire les sucres plus rapidement, et en plus grande quantité, la liqueur pouvant en effet diffuser plus rapidement dans la biomasse (Figure 17, [54]).

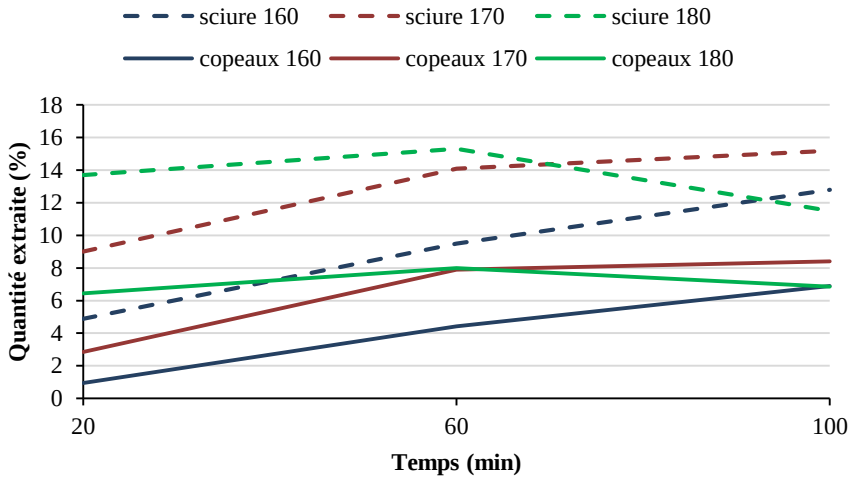


Figure 17 : Quantités d'hexoses extraites selon la température (160 et 170°C), la durée et la taille de la biomasse, pour une autohydrolyse de bois d'épicéa (adapté de [50])

Le ratio liqueur-sur-bois a peu d'influence sur la quantité de matière solide extraite, ou d'hémicelluloses ([55] pour une hydrolyse acide et Figure 18 pour des ratio L/B de 6 à 10). Une légère augmentation de la vitesse d'extraction peut être observée quand le ratio passe de 5 à 20 [56]. Cependant, le ratio L/B permet de modifier la concentration des saccharides extraits. Celle-ci a un impact conséquent sur la rentabilité du procédé de production d'éthanol, sachant que le coût de la distillation de l'éthanol est important, et est directement corrélé à la concentration en éthanol, donc en saccharides (cf. la partie C. 2.6 de ce chapitre).

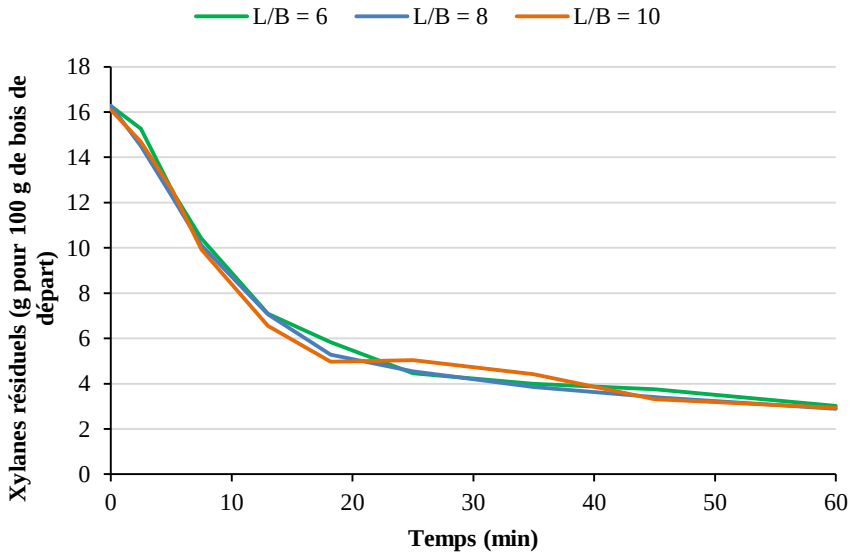


Figure 18 : Quantités de xylanes, en g pour 100 g de bois de départ, mesurées dans les copeaux d'eucalyptus ayant subies des autohydrolyses à 175°C selon différents ratios L/B (adapté de [51])

3.1.1.2 Impact sur les copeaux : cuisson kraft et blanchiment

Une thèse a été menée en parallèle à celle-ci pour évaluer l'impact d'une autohydrolyse ou d'une hydrolyse acide sur la cuisson kraft et le blanchiment [57]. Tout d'abord, il est à noter que le lavage du bois préhydrolysé, préalablement à la cuisson, est bénéfique, puisqu'il conduit à une meilleure délignification en éliminant la liqueur acide résiduelle. Toutefois, le lavage des copeaux avant la cuisson est recommandé pour ne pas perdre de l'alcali en milieu acide. Le lavage des copeaux permet aussi de récupéré les saccharides solubilisés mais piégés dans les copeaux pour éventuellement les fermenter [53], [57]–[61]. Cela implique cependant des coûts énergétiques pour augmenter les teneurs en saccharides dans les eaux de lavage.
Le bois préhydrolysé possède une teneur en lignine plus importante que le bois de départ. Cependant, il est plus facile à délignifier, ce qui implique que la sévérité de la cuisson doit être moindre pour atteindre une même quantité finale de lignine dans le bois [53], [57], [58]. Toutefois, le rendement de la cuisson est généralement plus faible que la cuisson de référence pour atteindre un même indice kappa [57], [59], [62]. Ainsi, la quantité de pâte obtenue pour 100 g de bois est inférieure pour du bois préhydrolysé (dans des conditions similaires à cette thèse : 35 à 37 g, pour 44 à 48 g avec la cuisson de référence [57]). Les hémicelluloses résiduelles sont en effet extraites plus facilement après avoir subi un prétraitement [53]. Ceci s'applique également aux xylanes résiduels, alors qu'ils sont préservés lors d'une cuisson kraft classique. De plus, il semblerait que la formation d'acide hexenuronique pendant la cuisson soit limitée après une autohydrolyse. Par exemple, la teneur en acide hexenuronique après la cuisson kraft d'eucalyptus est de 9 mmol/kg quand une autohydrolyse a été pratiquée, alors qu'elle est de 46 mmol/kg après la cuisson de référence [63]. Réduire la formation de ces composés peut être avantageux si la pâte est destinée à être blanchie, car ils impliquent une surconsommation de certains réactifs utilisés. Pour améliorer le rendement, il est possible de diminuer l'alcali utilisé, mais la teneur en lignine résiduelle augmente également. Cet excès de lignine peut être éliminé facilement par un traitement à l'oxygène (stade O de blanchiment). Il a été en effet observé que la pâte autohydrolysée est délignifiée bien plus facilement par un blanchiment à l'oxygène, qu'une pâte issue de copeaux non traités [57], [58].
La cellulose est notablement affectée par le traitement d'autohydrolyse [53], [57]. Elle peut voir par exemple son degré de polymérisation viscosimètrique (DPv) passer de 1700 à 1500 après cuisson kraft. Néanmoins, dans certains cas le degré de polymérisation de la pâte peut être stable, voire augmenter [58], [63]. Dans ces cas cependant, il est possible que la baisse de viscosité pouvant être due à la cellulose soit compensée par le retrait des hémicelluloses.

3.1.2 Hydrolyse acide

Un acide minéral peut être ajouté pour augmenter la sévérité de l'autohydrolyse. Elle peut être effectuée à l'aide d'un acide concentré à faible température ou à l'acide dilué à température élevée.
L'hydrolyse à l'acide concentré (30 à 70% d'acide en solution [46]) s'est montrée efficace, mais son utilisation à l'échelle industrielle est compliquée. L'acide concentré est en effet très corrosif pour les équipements et son utilisation est plutôt onéreuse et nécessite une sécurité drastique. Enfin, il est surtout utilisé pour l'hydrolyse totale des saccharides (cellulose et hémicelluloses), et non pour l'extraction des hémicelluloses seules [7]. L'utilisation d'acide dilué est donc prédominante.

3.1.2.1 Composition de l'hydrolysat

Une multitude d'acides peut être ajoutée dans la liqueur, comme les acides phosphorique, oxalique, chlorhydrique, trifluoroacétique… [64]. Cependant, l'acide le plus souvent utilisé est l'acide sulfurique, qui est doté d'un pKa très faible, est plutôt bon marché et n'est pas volatile

[49]. Les concentrations utilisées sont de l'ordre de 0,5—1,5 % pour des températures comprises entre 120 et 160°C [7].
En utilisant un acide comme catalyseur, il est possible d'extraire la totalité des hémicelluloses si la sévérité est suffisante ([7], [46] et Figure 19). Néanmoins, la cellulose peut également être dégradée, comme le suggère la hausse de la concentration en glucose, plus importante que celle du mannose, sur la même figure [65]. L'hydrolyse étant importante, le taux de monomère est proche de 100% [57]. En revanche, une partie des monomères est dégradée, entrainant des concentrations en furfural, HMF et acide formique qui peuvent vite devenir élevées (Figure 20).

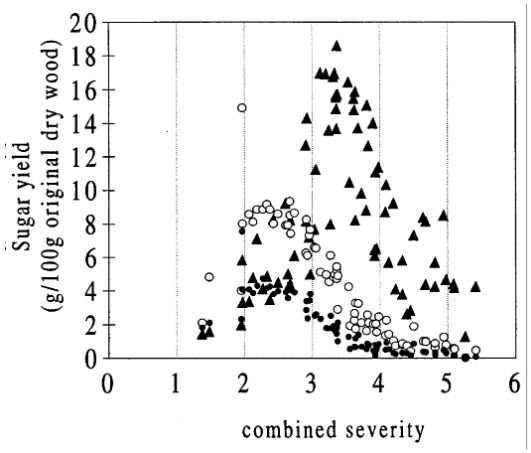


Figure 19 : Glucose (▲), mannose (○) et xylose (●) extraits selon la sévérité d'une hydrolyse acide (hydrolyse d'épicéa avec acide sulfurique) [66]

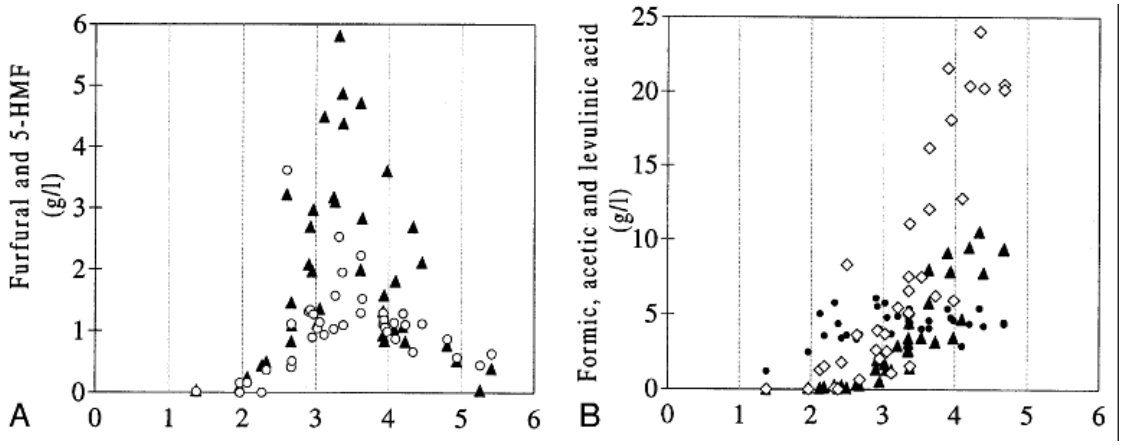


Figure 20 : Concentrations en furfural (○) et HMF (▲) (graphes A), acides formique (▲), acétique (●) et lévulinique (○) (graphe B) selon la sévérité d'une hydrolyse acide (hydrolyse d'épicéa avec acide sulfurique) [66]

L'impact d'une hydrolyse acide sur la lignine est relativement modeste dans les gammes de sévérité qui seront utilisées dans cette étude (dégradations de la cellulose et des monomères limitées), avec moins de 1,7 g de lignine extraite pour 100g de bois [53], [57].

3.1.2.2 Impact sur les copeaux : cuisson et blanchiment

Le comportement du bois hydrolysé à l'acide lors d'une cuisson kraft est sensiblement identique à celui de bois autohydrolysé. Le lavage de ces copeaux est indispensable avant la cuisson kraft [53], [57], [58]. Il est plus facile à délignifier, malgré sa plus haute teneur en lignine. Le rendement de la cuisson est plus faible pour atteindre un même indice kappa, comme il a déjà été vu dans le cas de l'autohydrolyse [67]. Le rendement global (extraction + cuisson) peut ainsi passer de 47,7 à 33% [57], ou encore de 46,6% à 32,8% [67]. De plus, la pâte présente une meilleure aptitude au blanchiment. La formation d'acide hexenuronique pendant la cuisson kraft est limitée dans des proportions plus importantes avec une hydrolyse acide qu'avec une autohydrolyse [63].
La cellulose est dégradée de manière plus importante après une hydrolyse acide qu'après une autohydrolyse. En effet, son DPv peut chuter par exemple de 1 700 à 1 000 par rapport à une pâte témoin, pour une hydrolyse relativement douce (CS de 1,85) [57], ou encore de 1268 à 908 [63].
Les conséquences de l'hydrolyse acide sur la qualité de la cellulose peuvent être un frein à son application pour l'extraction des hémicelluloses. Cependant, elle peut être utilisée comme traitement secondaire, mais à ce moment là uniquement sur l'hydrolysat issu de l'autohydrolyse, pour maximiser la proportion de monomères, après une autohydrolyse.

3.2 Extractions alcalines

L'extraction alcaline est une alternative pour l'extraction des hémicellulose. Elle se base sur la capacité à l'hydrolyse des saccharides (quoique modérée) et des LCC en milieu alcalin [7]. L'extraction alcaline ne permet pas d'obtenir des monomères directement. Il existe deux types d'extraction alcaline pour les hémicellulose : un pH élevé associé à une température modérée (<100°C), pour éviter la dégradation des hémicelluloses due au peeling [68]–[70], ou un pH proche de 7 et des températures plus élevées (130—160°C par exemple) [71]–[73]. Ce dernier cas est appelé extraction en milieu quasi-neutre (*Near Neutral Extraction*, NNE), et le réactif utilisé est généralement de la liqueur verte, coproduit de la cuisson kraft (cf. la partie B.2 de ce chapitre).

3.2.1 Extraction alcaline à basse température

Elle s'effectue généralement avec de la soude ou de la potasse, pendant plusieurs heures. Ce procédé appliqué sur du bois de feuillu a permis d'extraire entre 30% et 70% des hémicelluloses du bois en utilisant respectivement les conditions suivantes : 67 g/L de NaOH, soit 28% par rapport au bois à 90 °C pendant 4h [68], et 50 g/L, soit 250% / au bois à 70°C pendant 3h [69]. Les rendements d'extraction globaux sont relativement faibles, inférieurs à 12 g de matière extraite pour 100 g. La quantité de monomère extraite est infime [68].
La lignine Klason extraite est supérieure pour ces procédés à celle extraite lors des procédés acides (15% de la lignine Klason par exemple [68]).
Pour que ce procédé soit compétitif, il est nécessaire de recycler la soude utilisée, par ultrafiltration par exemple [39], [74]. De plus, une hydrolyse secondaire des oligomères est indispensable pour la production d'éthanol.
L'extraction alcaline n'a pas d'effet négatif sur la cuisson kraft. Le lavage des copeaux n'est pas nécessaire , et les propriétés mécaniques de la pâte ne sont pas affectées par le prétraitement [39], [68], [75], [76].

3.2.2 Extraction en milieu quasi-neutre (*Near Neutral Extraction, NNE*)

Le procédé NNE apparait comme plus avantageux que les autres traitements alcalins pour la production d'éthanol dans une usine kraft. En effet, il utilise de la liqueur verte, plus ou moins diluée, comme liqueur d'hydrolyse. Il est cependant plutôt appliqué à du bois de feuillus, dont les xylanes sont moins sensibles au peeling. Il faut noter que, bien que le pH de départ d'une NNE se situe aux alentours de 7,5—8, l'extraction se termine en milieu acide (pH compris entre 3 et 4). Ainsi, plus l'alcali de départ est faible, plus la quantité d'hémicellulose extraite sera élevée, l'extraction étant plus importante en milieu acide (Figure 21).

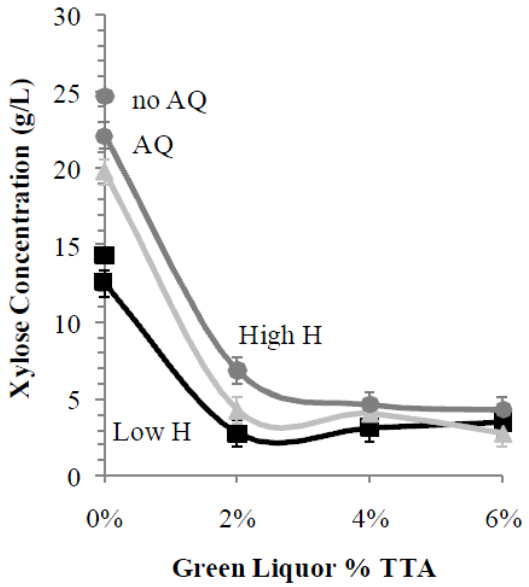


Figure 21 : Concentration en xylose obtenue après une NNE, selon différents alcalis (TTA : *Total Titrable Alkali)*. Extraction de bois de feuillu à 160°C pour différentes durées (donc différents facteurs H) ; L/B=4 ; Les extraction contiennent toutes 0,05% d'anthraquinone/bois excepté celle pour laquelle il est spécifié *no AQ* [71]

La quantité de sucres extraite est relativement faible (Figure 21, 1 g/L de xylose correspond à 0,4 g extraits pour 100 g de bois et Figure 22). Ils sont, pour la très grande majorité, présents sous forme oligomère [40].

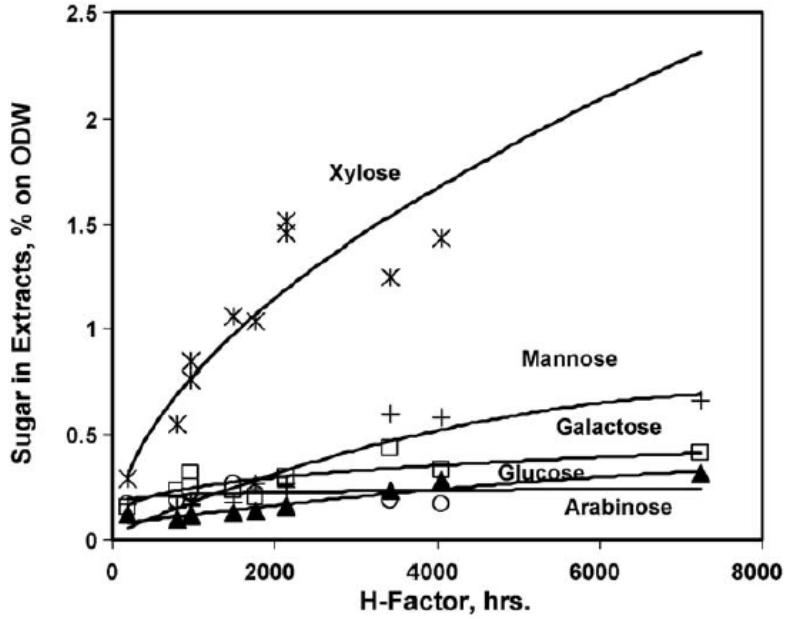


Figure 22 : Saccharides extraits d'une NNE en fonction du facteur H. traitement effectué sur du pin taeda avec de la liqueur verte (2% d'alcali) (○ arabinose ; □ galactose ; ▲glucose ; x xylose ; + mannose) [40]

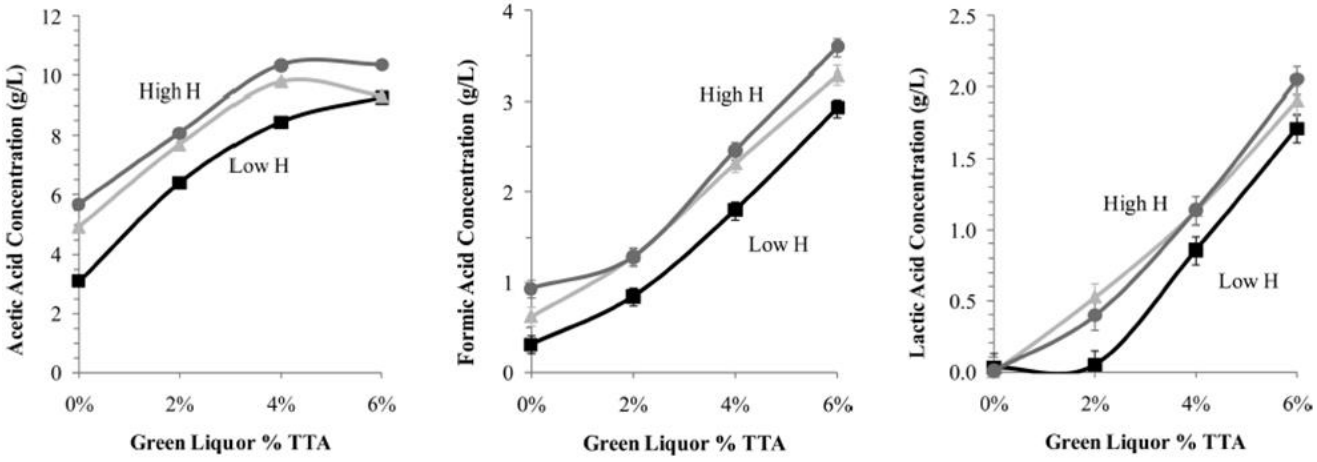


Figure 23 : Concentration en acides acétique, formique et lactique pour des NNE. Extraction de bois de feuillu à 160°C pour différentes durées (donc différents facteurs H) ; L/B=4 ; Les extraction contiennent toutes 0,05% d'anthraquinone/bois [71]

En revanche, de fortes concentrations en acide organiques sont relevées (Figure 23). Ils proviennent du peeling des hémicelluloses, et notamment des glucomannanes [71]. La dégradation des saccharides en HMF ou furfural est par ailleurs infime [72]. Les groupes acétyles sont libérés dans leur intégralité. Les concentrations en lignine mesurées sont relativement élevées, entre 4 et 9 g/L, soit entre 1,6 et 3,6 g pour 100g de bois [71]. La quantité de lignine extraite augmente avec l'alcali [40].

Ce procédé possède l'avantage de conduire à de meilleurs rendements de cuisson kraft qu'après une autohydrolyse. De plus, les fibres obtenues sont de meilleure qualité que les fibres de la

pâte issue de copeaux ayant subis une autohydrolyse, mais aussi que les fibres de la pâte témoin [77], quel que soit l'alcali utilisé lors de l'extraction.

L'utilisation de la NNE ne paraît pas efficace au regard de la quantité de saccharides extraite. Cependant, son implémentation dans une usine kraft est un avantage incontestable, étant donné qu'il utilise un réactif créé sur place, qu'il n'est pas nécessaire de laver la pâte entre l'extraction et la cuisson, et que les propriétés de la pâte sont améliorées par le prétraitement.

L'usage de liqueur verte en forte concentration a été également testé sur du bois de résineux [72]. Il ne s'agit toutefois pas de NNE, la liqueur verte ayant un pH de départ de 13. Les concentrations en saccharides obtenues sont alors relativement élevées, et leurs produits de dégradations respectifs restent faibles (Figure 24). Les concentrations obtenues à 130°C sont plus faibles, certainement du fait d'un peeling plus agressif. Ce traitement semble donc pouvoir être efficace.

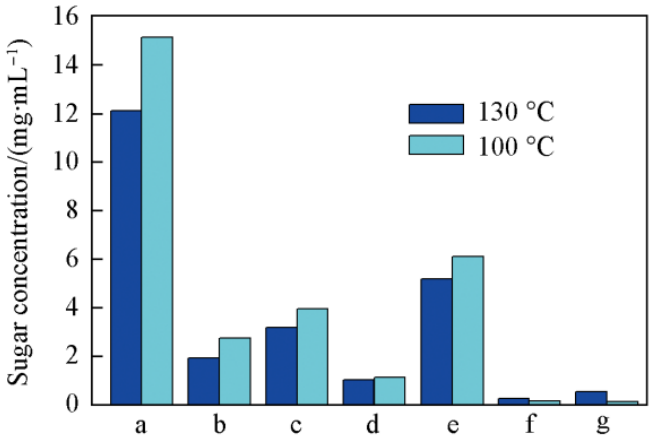


Figure 24 : Concentrations en saccharides mesurées après une extraction avec liqueur verte (Pin Douglas ; 3,5 h à 100 et 130°C ; a : mannose, b : galactose ; c : xylose, d : arabinose, e : glucose, f : furfural, g : HMF) [72]

Les traitements alcalins ont moins d'impact sur la cuisson kraft que les traitements acides puisqu'ils se déroulent dans un milieu similaire. Ainsi, le rendement global de l'extraction suivie de la cuisson est similaire à celui d'une cuisson seule [39], [78]. Cela signifie que l'extraction des hémicelluloses et la production d'éthanol n'a pas d'impact sur la production de pâte. Le lavage des copeaux avant cuisson n'est pas nécessaire. De plus, les caractéristiques de la pâte ne sont pas affectées, que ce soit avec un traitement alcalin à basse température ou avec une NNE [39], [68], [77], [78].

3.3 Explosion à la vapeur

L'explosion à la vapeur est un traitement se déroulant en deux étapes qui permet non seulement d'hydrolyser et d'extraire les saccharides, mais également de déstructurer la biomasse. La première phase est le vapocraquage, pendant laquelle la vapeur sous forte pression (jusqu'à 40 bars, 250°C) pénètre dans les copeaux. Ces conditions conduisent à l'hydrolyse des polysaccharides. Après quelques minutes, une brutale décompression est appliquée, déstructurant la biomasse [79]. La réaction peut être catalysée par du dioxyde de soufre (SO_2) [80]–[83] ou de l'acide sulfurique [7].

Un traitement mené à 175°C, avec 4,5% de SO_2 pendant 7,5 min sur du pin de Douglas a permis d'extraire 70% des hémicelluloses [81] ou 86% des hexoses [80], l'immense majorité sous forme monomère. De plus, les concentrations en HMF et furfural ne dépassent pas 0,5 g/L. Un traitement plus sévère (215°C, 6,6 min, 2,38% SO_2) entraîne une forte dégradation des saccharides. La quantité d'hémicelluloses dans l'hydrolysat chute à 37,5%

L'extraction d'hémicelluloses est très efficace par ce traitement. Toutefois, la décompression dégrade énormément les fibres. Il est donc impossible d'en faire de la pâte de bonne qualité, mais cela constitue un prétraitement intéressant avant une hydrolyse enzymatique de la cellulose [81]. Ainsi l'explosion à la vapeur est utilisée majoritairement pour faire de l'éthanol cellulosique (à partir des hémicelluloses et de la cellulose).

3.4 Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique s'est imposée pour la production d'éthanol à partir d'amidon [84]. Elle est cependant encore loin d'être efficace pour l'éthanol de seconde génération. Elle est utilisée jusqu'à l'échelle pilote pour l'hydrolyse de la cellulose (voir par exemple les projets NILE [85], [86] et FUTUROL [14], [87]). Trois classes d'enzymes différentes sont alors nécessaires. Les exo-1,4-β-d-glucanases produisent du cellobiose en partant des extrémités de la cellulose, les endo-1,4-β-d-glucanases hydrolysent les liaisons glycosidiques internes à la cellulose, pour créer de nouvelles extrémités réductrices, et enfin les 1,4-β-d-glucosidases convertissent la cellobiose en glucose [88], [89].
En ce qui concerne les hémicelluloses, le cocktail d'enzymes nécessaire est encore plus important, sachant que chaque enzyme admet comme substrat un type de liaison spécifique. Ne serait-ce que pour les GGM, il est indispensable de posséder des endo-1,4-β-mannanases, des β-mannosidases, des β-glucosidases, des α-galactosidases ainsi que des acetylmannane-esterases si les groupes acétyles doivent être libérés [7], [88], [90]. Ces enzymes peuvent être produites à partir de microorganismes, comme *Trichoderma reesei* [91] ou encore *Penicillium purpurogenum* [92].
L'efficacité des enzymes est réduite par leur inhibition à leur produit, leur propre substrat, ainsi que par les composés phénoliques [88]. Ce procédé reste cependant séduisant pour une hydrolyse secondaire, après autohydrolyse ou extraction alcaline. En effet, il limiterait la dégradation des monosaccharides et pourrait réduire la libération des groupes acétyles, inhibiteurs pour la fermentation (cf. la partie C.2.2 de ce chapitre). Ce procédé faciliterait la fermentation, mais diminuerait la matière première fermentescible, un hexose lié à un groupe acétyle ne pouvant pas être transformé en éthanol. Les hémicelluloses étant solubilisées, l'action des enzymes est facilitée. Néanmoins, pour obtenir une hydrolyse enzymatique efficace et rentable, les microorganismes doivent être améliorés, la manipulation génétique semblant être la voie la plus prometteuse [7].

3.5 Bilan sur les extractions

Parmi les prétraitements présentés, trois apparaissent comme plus intéressants : l'autohydrolyse, l'hydrolyse acide et la NNE, chacun possédant des avantages et des inconvénients. Comparée à l'hydrolyse acide, l'autohydrolyse limite la dégradation de la cellulose et des monomères. Cependant, la quantité d'hémicelluloses extraite est plus faible, et une hydrolyse secondaire est nécessaire. La NNE permet d'extraire seulement une quantité limitée d'hémicelluloses, sous forme d'oligomère de surcroît. Néanmoins, son impact sur la pâte est positif puisque ni le rendement global (pas de baisse de production de pâte), ni la qualité de la pâte ne sont affectés. De plus, le pH final de l'extraction est adapté à une fermentation, celui-ci étant légèrement acide. Enfin, le réactif utilisé est une liqueur résultant du procédé kraft. Cependant, la dégradation des saccharides par peeling a pour conséquence une concentration

conséquente en acides organiques, qui sont de forts inhibiteurs de la fermentation (cf. la partie C.2.2 de ce chapitre).

C. La production de bioéthanol

1 Le point sur les biocarburants

Le terme biocarburant désigne un carburant fabriqué à partir de biomasse, et non que la biomasse provient de culture biologique. Pour éviter toute confusion, le terme agrocarburant peut également être employé.

Petit historique des biocarburants

L'utilisation de l'éthanol et des huiles végétales comme carburant n'est pas récent. Dès le début du XXème siècle, les grands industriels Henry Ford et Rudolph Diesel en faisaient leurs carburants de prédilection [6]. Cependant, l'avènement de la pétrochimie quelques années plus tard mit un terme durable à leur expansion, les carburants issus du pétrole étant plus rentables et disponibles en grande quantité. De plus, l'impact environnemental de l'utilisation de ces carburants n'était alors pas une préoccupation.
En 1923 fut inventé par les docteurs Franz Fischer et Hans Tropsch le procédé qui porte leur nom [93], et qui permet la conversion de monoxyde de carbone et d'hydrogène en hydrocarbures. Ce procédé fut appliqué à grande échelle pendant la seconde guerre mondiale par l'Allemagne et le Japon pour produire du carburant à partie de charbon. De même, dès les années 1950, l'Afrique du Sud investit dans ce procédé, toujours à partir de charbon, pour fabriquer des hydrocarbures alors qu'elle est économiquement isolée en raison de l'apartheid. Même s'il ne s'agit pas de biocarburants à proprement parler, la mise au point et le développement de ce procédé permet aujourd'hui d'envisager la synthèse de biocarburants à partir de gaz de synthèse (ou *syngas*) résultant de la gazéification de biomasse.
Il a fallu attendre les chocs pétroliers de 1973 puis 1979 pour voir apparaître un regain d'intérêt pour les biocarburants. Deux pays s'y consacrent durablement, le Brésil et les États-Unis. Le Brésil, alors dépendant des importations de pétrole, développe un programme de production en masse de bioéthanol, appelé proalcool. Fort d'une gigantesque surface cultivable et d'une industrie de la canne à sucre mature, le gouvernement encourage la production d'éthanol et de véhicules fonctionnant avec ce carburant. Depuis, le Brésil s'est également lancé dans un vaste projet encourageant la production de biodiesel [94]. Les Etats-Unis développent quant à eux le gasohol, mélange de diesel et d'éthanol. Cependant, l'intérêt pour les biocarburants s'estompe rapidement avec la chute du coût du baril suivant le choc pétrolier de 1979. Différents facteurs conjoncturels vont permettre de relancer l'attrait des biocarburants : il y a eu bien sûr une nouvelle hausse du baril de pétrole dès 2008, mais d'autres éléments s'y sont ajoutés, surtout dans les pays développés. Les considérations environnementales sont en effet de plus en plus présentes, les industries de la biomasse sont à l'affut de nouveaux débouchés et les pays importateurs de pétrole souhaitent limiter leur dépendance énergétique. De plus, les ressources fossiles ne sont pas inépuisables, et des substituts devront être trouvés dans les prochaines décennies.

Le biodiesel s'est développé plus rapidement que l'éthanol, notamment en Europe, où un parc de véhicules diesel conséquent est présent. Fabriqué à partir de la trans-estérification ou l'hydrogénation d'huile végétale (Colza, tournesol, soja, palme…), sa production s'est accrue dans l'union européenne, et notamment en France. Cependant la production de biodiesel à partir d'huile de palme est en nette augmentation dans d'autres pays. De nos jours, l'huile est transformée directement sur place (Argentine, Thaïlande, Singapour [95], [96]) ou dans les ports européens comme Rotterdam.

Les biocarburants aujourd'hui

L'essence et le diesel sont les carburants les plus utilisés. La production de biodiesel à partir d'huile végétale permet d'obtenir un produit quasiment identique au diesel. Il n'existe pas d'équivalent à l'essence. Celle-ci peut cependant être remplacée par un alcool, comme l'éthanol, le butanol ou encore le méthanol. L'éthanol est privilégié du fait de sa production actuelle et potentielle importante. Le Tableau 8 résume les consommations et les productions de biocarburants pour le monde, l'Union Européenne, la France et deux pays fortement engagés dans les biocarburants : les Etats-Unis et le Brésil. Le Brésil a un taux d'incorporation de 20%, supérieur aux autres pays, pour lequel il avoisine les 3—6%.

	Consommation (ktep)		Production (ktep)		
	Essence	Diesel	Ethanol	Biodiesel	% d'incorporation biocarburants
Monde	906 297	842 436	43 478 (4,6%)	18 470 (2,2%)	3%
Union Européenne	88 704	190 015	2 104 (2,3%)	8 166 (4,1%)	4%
France	7 531	31 764	506 (6,3%)	1 555 (4,7%)	5%
Etats-Unis	351 392	128 993	2 6451 (7,0%)	2 887 (2,2%)	6%
Brésil	20 428	34 297	11 412 (35,8%)	2 107 (5,8%)	20%

Tableau 8 : Consommation de carburants et production de biocarburants dans les transports en 2011 (entre parenthèses, le taux d'incorporation) [98]–[100]

L'Union Européenne a fixé des objectifs d'incorporation de biocarburants pour ses états membre. Ceux-ci sont résumés dans la directive 2009/28/CE du 23 avril 2009. La part d'énergie renouvelable utilisée dans les transports doit être au minimum de 10%. Un carburant est dit renouvelable si la réduction des émissions de gaz à effet de serre résultant de l'utilisation de ce carburant est d'au moins 35% aujourd'hui par rapport au carburant fossile de référence, puis 50% en 2017 et enfin 60% en 2018, selon un calcul préconisé dans la directive (article 17). Ce calcul fait d'ailleurs encore débat aujourd'hui, notamment parce qu'il ne prend pas toujours en compte le changement d'affectation des sols indirect (CAS indirect, voir la partie 1.1.3 ci-dessous).

1.1.1 Le biodiesel

Le biodiesel représente 27% des biocarburants dans le monde, mais plus de 77% en Europe, où il s'est fortement développé [96] Il est notamment présent dans les pays où l'utilisation de ce carburant a (ou a été) encouragée, comme l'Allemagne ou la France. Par ailleurs, certains pays sont devenus exportateurs de biodiesel. Ceux-ci disposent généralement de ressources abondantes (Argentine, Indonésie, Thaïlande) ou d'un régime fiscal favorable comme les Etats-Unis (Figure 25). Les pays acheteurs sont généralement européens, et en ont besoin afin d'atteindre leurs quotas d'incorporation. Les pays de l'Union Européenne représentent ainsi 82% des importations en biodiesel, principalement d'Argentine (qui est le premier exportateur) et de Thaïlande [96].

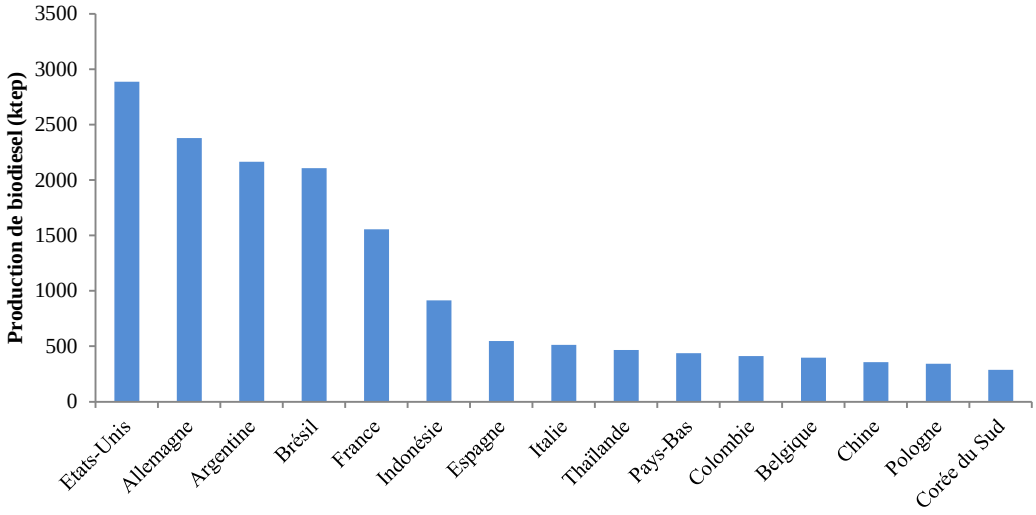


Figure 25 : Production de biodiesel en 2011 pour les 15 premiers producteurs [100]

1.1.2 Le bioéthanol

Les carburants contenant de l'éthanol sont désignés selon la nomenclature E suivie du pourcentage volumétrique d'éthanol maximal qu'il peut contenir (l'E10 contient donc 10% d'éthanol au maximum). L'éthanol peut être utilisé directement comme carburant, ou transformé préalablement en ETBE (Ethyl Tert Butyl Ether) en le faisant réagir avec de l'isobutène. L'ETBE est généralement préféré en Europe car son pouvoir calorifique est plus important que celui de l'éthanol (PCI de 35,9 MJ/kg contre 26,8 MJ/kg pour l'éthanol, et 42,7 MJ/kg pour l'essence). De plus, l'incorporation d'éthanol en faible quantité dans l'essence peut entrainer l'apparition d'eau dans le carburant, ce qui n'est pas le cas en utilisant de l'ETBE. Cependant, l'isobutène est dérivé du pétrole, ce qui rend l'ETBE moins « vert » que l'éthanol. Ainsi, 37% (en masse) de l'ETBE est considéré comme étant renouvelable [101]. La part maximale d'ETBE admissible dans l'E10 est alors de 22% (en volume).

La majorité des véhicules à essence produits de nos jours sont conçus pour rouler avec le carburant E10. Les véhicules flex-fuel, courants au Brésil, peuvent rouler aussi bien à l'essence qu'à l'E85. La principale différence concernant leur moteur est la mise en place de durites et de joints résistant à l'éthanol, plus corrosif que l'essence.

Comme exposé précédemment, l'éthanol a un pouvoir calorifique plus faible que l'essence, ce qui induit une consommation plus importante (20 à 35%). Cependant, son plus fort indice d'octane permet au véhicule de développer plus de puissance.

Deux pays représentent 87% de la production de bioéthanol dans le monde, les Etats-Unis (61%, 26 500 ktep en 2011) et le Brésil (26%, 11 400 ktep en 2011). Viennent ensuite la Chine et le Canada, dans des proportions beaucoup plus modestes (Figure 26).

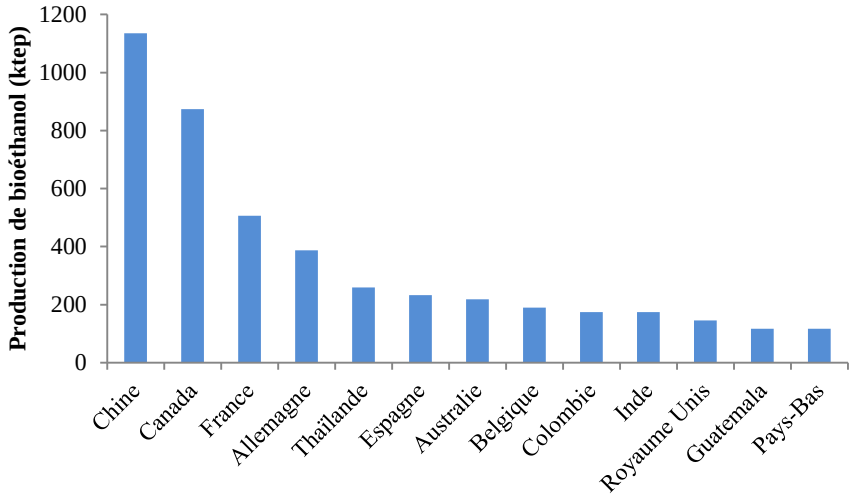


Figure 26 : Production de Bioéthanol en 2011, en dehors des Etats-Unis et du Brésil [99].

Ces chiffres sont à mettre en correspondance avec la consommation d'essence (Figure 27), qui montre réellement l'effort entrepris par un pays pour utiliser de l'éthanol. Le Brésil a, du fait de sa politique menée depuis les années 1970, un taux d'incorporation d'éthanol bien plus élevé.

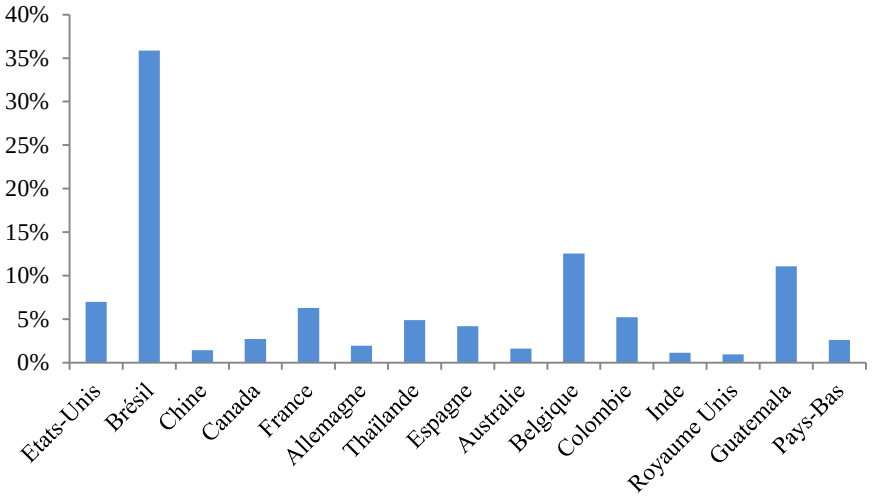


Figure 27 : Ratio (énergétique) entre la production de bioéthanol et la consommation d'essence pour le transport (2011) [99], [100]

Un nombre d'échanges plus faible concernant l'éthanol que le biodiesel est observé. Les États-Unis exportent une partie de leur production, notamment vers le Canada et l'Union Européenne [96].

L'immense majorité du bioéthanol est produit à partir de canne à sucre (Brésil), de betterave France) ou de céréales (Etats-Unis, Asie, Europe). Il s'agit d'éthanol de première génération, fabriqué à partir de ressources alimentaires. L'utilisation de telles ressources a eu un impact sur les cours des ressources alimentaires, et peut être incriminé comme l'une des causes des nombreuses pénuries alimentaires de par le monde [102]. Il est donc nécessaire de développer une seconde génération de bioéthanol, qui serait fabriquée à partir de biomasse lignocellulosique (bois, paille,…), qui ne constitue pas une ressource directe pour l'alimentation humaine.

1.1.3 Considérations environnementales

La production de biocarburant est incitée pour plusieurs raisons. Ils doivent suppléer le pétrole quand celui-ci se raréfiera et diminuer la dépendance énergétique aux pays exportateurs de pétrole. Cependant, l'avantage prédominant d'un biocarburant est d'être vertueux pour l'environnement. En effet, l'utilisation d'un biocarburant forme un cycle court de carbone : les végétaux, pendant leur croissance, captent le dioxyde de carbone de l'atmosphère qui sera relâché lors de la combustion du carburant. Cependant, utiliser un biocarburant n'a pas un effet neutre sur l'environnement puisque la culture de la biomasse, la fabrication du carburant et son transport nécessitent de l'énergie, souvent non renouvelable, qui implique une production de gaz à effet de serre (GES).

L'Union Européenne, d'après des rapports d'expertise, a fixé des valeurs de références, indiquant la quantité de gaz à effets de serre (dioxyde de carbone, méthane et dioxyde d'azote) émise par rapport à un carburant fossile de référence (Tableau 9). Selon ce document, Les carburants de seconde génération génèrent moins de gaz à effet de serre que ceux de première génération.

	Réduction des émissions de gaz à effet de serre
Ethanol de betterave	52%
Ethanol de blé	16 à 69 %*
Ethanol de maïs	49%
Ethanol de canne à sucre	71%
Biodiesel de colza	38%
Biodiesel de tournesol	51%
Biodiesel de soja	31%
Biodiesel d'huile de palme	19-56%*
Huile végétale hydrotraitée, colza	47%
Huile végétale hydrotraitée, tournesol	62%
Huile végétale hydrotraitée, huile de palme	26-65%*
Ethanol de paille de blé	85%
Ethanol de déchet de bois	80%
Ethanol de bois cultivé	76%

Tableau 9 : Réduction des émissions de gaz à effet de serre par rapport au carburant fossile de référence (essence ou diesel) *dépend du combustible utilisé et du type de chaudière (normale ou cogénération). L'impact du changement d'affectation des sols n'est pas pris en compte [101]

Ces résultats peuvent être comparés à une analyse de cycle de vie (ACV) menée sur différents biocarburants de première génération (Tableau 10). Cette ACV ne prend pas en compte le CAS. De plus, la combustion d'un biocarburant est considérée comme ne générant pas de GES. En général, le biodiésel est plus efficace d'un point de vue environnemental, devant l'éthanol et l'ETBE. L'éthanol de canne à sucre, dont l'étude porte sur la production brésilienne, présente cependant de grandes qualités environnementales.

		Energie primaire non renouvelable		Emission de GES	
		MJ/MJ	Réduction (%)	kg eq.CO_2/MJ	Réduction (%)
Carburants référence	Essence	1,22		0,0901	
	Diesel	1,25		0,0914	
Biodiesel	Colza	0,431	66%	0,0372	59%
	Tournesol	0,401	68%	0,0251	73%
	Soja	0,387	69%	0,0211	77%
	Palme	0,271	78%	0,0218	76%
	Huile végétale pure	0,226	82%	0,0318	65%
Ethanol	Blé	0,62	49%	0,0462	49%
	Maïs	0,575	53%	0,0398	56%
	Betterave	0,592	51%	0,0304	66%
	Canne à sucre	0,183	85%	0,0253	72%
ETBE	Blé	1,00	18%	0,0686	24%
	Maïs	0,958	21%	0,0621	31%
	Betterave	0,976	20%	0,0526	42%
	Canne à sucre	0,561	54%	0,0475	47%

Tableau 10 : Energie primaire non renouvelable utilisée pour la conception des carburants (MJ d'énergie non renouvelable par MJ de carburant) et émission de GES pour la conception et l'utilisation du carburant [103]

Par ailleurs, la toxicité des biocarburants sur l'être humain ainsi que sur l'environnement a également été évaluée et comparée aux carburants fossiles de référence [103]. Ainsi, l'utilisation de biodiesel est très favorable pour la santé humaine, sa combustion émettant bien moins de composés toxiques que celle du diesel. Ce n'est pas le cas du bioéthanol, dont la conception produit des molécules nocives. L'utilisation d'engrais et de pesticides est en effet néfaste, non seulement pour l'homme, mais également pour l'environnement (eutrophisation de milieu).

Les biocarburants paraissent donc globalement bénéfiques pour l'environnement, mais la prise en compte de CAS, notamment indirect, peut remettre en cause ce bilan.
Il existe deux sortes de CAS, direct et indirect. Le CAS direct correspond à la mise en culture d'une surface (cultivée ou non) pour produire du biocarburant. Le CAS indirect correspond à la mise en culture d'une terre dédiée à l'alimentaire pour produire du biocarburant. Dans ce cas, il est légitime de penser qu'une autre terre sera allouée, quelque part sur terre, à la production de denrées alimentaires pour compenser la perte de production. L'impact des CAS dépend du type de terrain qui a été alloué à la nouvelle culture, et notamment de la quantité de carbone qu'il peut piéger. Les terrains piégeant le plus de carbone sont les forêts (notamment les forêts primaires tropicales), les tourbières, puis dans une moindre mesure les savanes et prairies.

L'impact du CAS direct sur les émissions de GES est le plus facile à évaluer. Il est considéré comme nul en Europe, où les surfaces dédiées aux biocarburants étaient déjà des surfaces cultivées, donc ne retenant pas plus de carbone. Les impacts sont beaucoup plus incertains sur les autres continents, et peuvent être aussi bien négatifs que positifs. Ainsi, l'allocation d'une parcelle de forêt primaire pour cultiver de la canne à sucre au Brésil a pour résultat d'obtenir un éthanol émettant plus de GES que de l'essence [103]. *A contrario,* un scénario optimiste : l'allocation d'une terre arable à faible rendement pour la culture de colza ou soja peut avoir un effet bénéfique sur le bilan, sachant que ces plantes stockent du carbone dans leur tourteau.

L'impact du CAS indirect est par contre beaucoup plus problématique. La réallocation du sol peut avoir lieu aux antipodes de la culture de biocarburant, et dépend des données économiques du moment. Ce CAS indirecte concerne donc également les pays européens, et son impact fait débat aujourd'hui sur les avantages réels des biocarburants.

De Cara et al. comparent dans une étude 485 références traitant de l'impact des CAS sur les émissions des gaz à effet de serre [104]. Quand les émissions de GES dues aux CAS direct et indirect, à la production, à la transformation et à la distribution des carburants sont pris en compte, seules 50% des références concluent à un bilan positif des émissions comparées au carburant de référence, 80% ne rejoignent pas les objectifs de l'Union Européenne (réduction des GES de 35%). L'impact des différentes cultures sur le CAS a été évalué, ainsi que les carburants (Tableau 11). Les CAS des cultures dédiées au biodiesel sont en général plus émetteurs en GES que les cultures dédiées à l'éthanol. Ces résultats se retrouvent dans le classement des biocarburants de première génération. Seules quelques études ont été menées sur le bioéthanol de deuxième génération sans pouvoir se référer à des données industrielles réelles, contrairement aux carburants de première génération. Il en ressort cependant que les CAS de l'éthanol fabriqué à partir de matière lignocellulosique est à l'origine d'émissions de GES plus faibles.

	Emissions (g eq. CO_2 /MJ)	Nombre de références
Soja	79	64
Palme	55	52
Colza	54	79
Maïs	54	90
Canne à sucres	30	62
Blé	17	65
Betterave	8	48
Biodiesel de 1ère génération	61	221
Ethanol de 1ère génération	31	285
Ethanol de 2ème génération	18	13

Tableau 11 : Emissions de GES dues au CAS (valeur médiane des références) [104]

Une grande variation dans les résultats obtenus est observée, dont seules les moyennes sont exprimées ici. Il faut savoir que le CAS varie en fonction de la région où est produit le carburant (les émissions de GES les plus élevées sont en Amérique Latine) et de la région de destination du carburant.

1.1.4 Potentiel des biocarburants

Le but à terme des biocarburants est de suppléer les carburants fossiles. Il est cependant évident que pour s'émanciper des dérivés pétroliers, ils ne suffiront pas et qu'un panel de solutions doit être apporté, comportant également la diminution globale des consommations et le développement d'autres alternatives comme la voiture électrique. Le Brésil, pays qui a massivement investi dans les biocarburants, n'incorpore « que » 20% de biocarburants. En effet, les surfaces nécessaires à la production de biocarburants sont très importantes. Pour se donner une idée, les surfaces nécessaires ont été calculées pour remplacer les carburants fossiles actuels en France (Tableau 12). Concernant le biodiesel, il faudrait consacrer au moins 85% de la superficie agricole française pour s'affranchir du diesel fossile. L'essence étant minoritaire, les cultures à y consacrer seraient moins étendues, mais il semble difficilement envisageable d'attribuer 7% (au minimum) de cultures alimentaires à la production de carburants. En ce qui concerne le bois, la production d'éthanol cellulosique requerrait d'exploiter plus de la moitié de la surface forestière française. Il n'est de toute manière pas rentable de produire de l'éthanol à partir de bois cultivé, il ne peut être produit qu'à partir de « déchets » ou de plantes annuelles [38].
L'objectif fixé à 10% d'énergie renouvelable dans les transports est difficilement envisageable pour le biodiesel. Il faudrait certainement adjuger une plus grande part à l'éthanol, dont les productions sont plus rentables, et qui peut être fabriqué à partir de biomasse lignocellulosique. D'autre part, des recherches sont menées pour synthétiser du biodiesel à partir d'algues (biocarburants de troisième génération), dont la production au km^2 pourrait être plus importante que les cultures traditionnelles.

		Production biocarburant (tep/km^2)	Surface nécessaire pour substituer entièrement le carburant concerné (km^2)	Pourcentage de la surface concernée[1]	Surface pour atteindre l'objectif de l'UE (10% d'énergie renouvelable)
Biodiesel	Colza	135,34	246 183	85%	8,5%
	Soja	47,99	694 361	239%	23,9%
	Tournesol	98,43	338 501	116%	11,6%
	Palme	389,62	85 516	29%	2,9%
Bioéthanol	Blé	153,73	52 281	18%	1,8%
	Maïs	204,42	39 316	14%	1,4%
	Betterave	393,54	20 422	7%	0,7%
	Canne à sucres	328,57	24 461	8%	0,8%
	Bois (cellulose + hémicelluloses)	91,73	87 617	55%	5,5%
	Bois (hémicelluloses)	28,22	284 755	178%	17,8%
	Miscanthus	188,16	42 713	15%	1,5%
	Switchgrass	164,64	48 815	17%	1,7%

Tableau 12 : Superficie cultivée ou forestière nécessaire pour substituer les carburants fossiles par des biocarburants (rendements agricoles : [84], [103], [105], consommation carburants en 2011 [98]) ; [1]superficie agricole française : 291 000 km^2, superficie forestière française : 160 000 km^2[29].

D'un point de vue économique, le défi est également important pour fabriquer des biocarburants concurrençant les carburants fossiles. Seul le Brésil peut prétendre d'y arriver pour l'éthanol,

qui n'est plus subventionné depuis 1997. Il a fallu pour cela plus de 20 ans. Dans les autres pays, les biocarburants de première génération sont systématiquement subventionnés ou soumis à des déductions d'impôts.

2 La fabrication de bioéthanol

2.1 Concept de fermentation éthanolique

La fermentation éthanolique est un processus mené par une multitude de microorganismes. Pour ceux-ci, l'éthanol n'est qu'un sous-produit de leur production d'énergie, cette dernière étant essentiellement vouée à leur reproduction. Ainsi, la production d'éthanol est directement corrélée à sa croissance [106]. Les réactions globales de fermentation anaérobies (les plus efficaces) pour les hexoses et les pentoses sont données par les Equations 16 (établie par Gay-Lussac) et 17 [107]:

Equation 16

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Equation 17

$$3C_5H_{10}O_5 \rightarrow 5C_2H_5OH + 5CO_2$$

Les rendements, calculés d'un point de vue stœchiométrique et appelés rendements de Gay-Lussac, sont de 51,1 g d'éthanol pour 100 g de sucres. Ce rendement sert de référence pour évaluer les fermentations (rendement théorique). Cependant, ces équations ne prennent pas en compte la biomasse créée à partir des sucres, ni les autres sous-produits de la fermentation.
En ce qui concerne les hexoses, Louis Pasteur a déterminé un rendement théorique maximal pour l'éthanol de 48,4 g pour 100 g de sucres [84]. Il a en outre observé qu'environ 3% des sucres sont convertis en glycérol, 0,5% en acide succinique et 0,5—0,8% en alcool de fusel. Seuls 0,8 à 1% des sucres sont utilisés pour l'accroissement de la biomasse. D'autres sous-produits existent et sont présents en très faibles quantités, comme par exemple l'acide acétique. Au niveau industriel, le rendement obtenu pour l'éthanol de première génération est de 90—92% du rendement théorique, soit 46 à 47 g d'éthanol par gramme de sucres fermentescibles.
Pour les pentoses, la proportion des autres sous-produits et l'accroissement de la biomasse a un impact plus important. En effet, le rendement peut chuter à 26 g d'éthanol pour 100 g de pentoses du fait de l'accroissement de la biomasse [107]. L'éthanol n'est pas toujours le sous-produit le plus abondant, concurrencé par le xylitol sous certaines conditions, comme une fermentation en milieu totalement anaérobie par exemple [107], [108].

Une fermentation se déroule en trois phases (Figure 28), avec tout d'abord une phase de latence, durant laquelle le microorganisme s'habitue à son nouvel environnement. Elle peut être plus ou moins longue selon le stress occasionné par cet environnement. Vient ensuite une phase de développement exponentiel, qui s'achève par une phase stationnaire qui débute quand les nutriments commencent à manquer. La concentration en éthanol atteint alors un maximum, puis peut commencer à décroître.
Pour vivre, les microorganismes ont besoin d'une source de carbone (fournit par les sucres) et une source d'azote, qui doit généralement être ajoutée au milieu de fermentation. De plus, les

fermentations sont plus efficaces en milieu anaérobie, mais une micro-aération peut être bénéfique [84]. Elle est même quasiment indispensable pour la fermentation des pentoses.

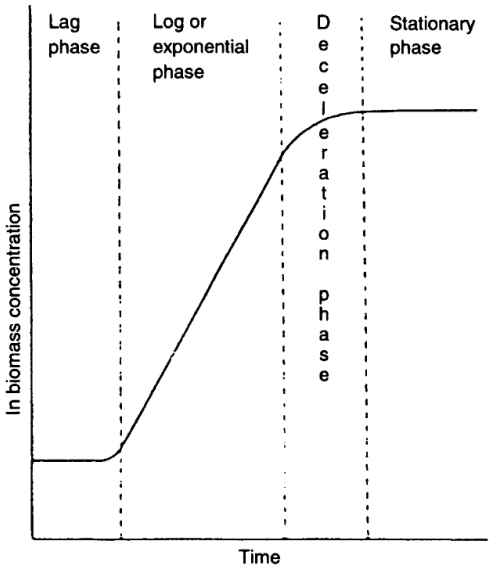


Figure 28 : Développement typique de biomasse lors d'une fermentation batch [109]

Les microorganismes sont plus performants quand ils ne sont pas stressés par leur environnement. Le stress peut provenir de plages de température et de pH non adaptées, d'une trop forte présence d'oxygène, ou de la présence d'inhibiteurs de fermentation dans leur milieu. Il faut également savoir qu'une trop forte concentration en substrat ou en éthanol a également des effets inhibiteurs [84], [106], [110]. L'impact de ces facteurs dépend du microorganisme.

2.1.1 Microorganismes utilisés

Beaucoup d'organismes sont susceptibles de produire de l'éthanol à partir de sucres. Trois d'entre eux font particulièrement l'objet d'études, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* et *Escherichia coli.* Le choix d'un microorganisme dépend bien entendu de sa capacité à produire de l'éthanol (rendements, productivité, type de substrat), mais également de sa facilité d'utilisation (organisme non pathogène, robustesse, possibilité de recyclage) et de ses conditions de fonctionnement. Certains facteurs peuvent ainsi défavoriser la contamination du milieu par d'autres microorganismes utilisant les sucres à d'autres fins que la production d'éthanol (pH très acide, hautes températures…). Or une contamination est à éviter absolument au niveau industriel, car elle nécessite de stériliser toutes les installations avant de relancer la production à partir de microorganismes « neufs ».

2.1.1.1 Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae est une levure intensément utilisée par l'Homme. Elle est exploitée depuis longtemps dans la fabrication de boissons alcoolisées, comme la bière, ainsi que dans la confection de pain, c'est pourquoi elle est appelée communément levure de bière ou levure de boulangerie. Cette levure est utilisée pour la fermentation d'éthanol de première génération. Ce microorganisme faisant l'objet de cette étude, sa description sera présentée en détails et la suite du manuscrit sera plutôt focalisée sur cet organisme.

Cette levure utilise comme substrat les hexoses, et peut atteindre des rendements en éthanol de 90—93% par rapport au rendement théorique [106]. Pour la fermentation de glucose ou mannose, sa voie métabolique (Figure 29) utilise un processus bien connu pour produire de l'énergie dans le monde du vivant, la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas), qui permet d'obtenir deux moles de pyruvate et deux moles d'adénosine-5'-triphosphate (ATP, molécule fournissant l'énergie dans les organismes vivants) à partir d'une mole de glucose ou de mannose. Le pyruvate est ensuite réduit en éthanol et glycérol dans des proportions variables. Le métabolisme utilisant le galactose est différent, car il doit tout d'abord être transformé en glucose-6-phosphate selon une autre voie métabolique (voie de Leloir). Pour cette raison, le galactose n'est utilisé par la levure qu'à défaut de glucose ou mannose [111].

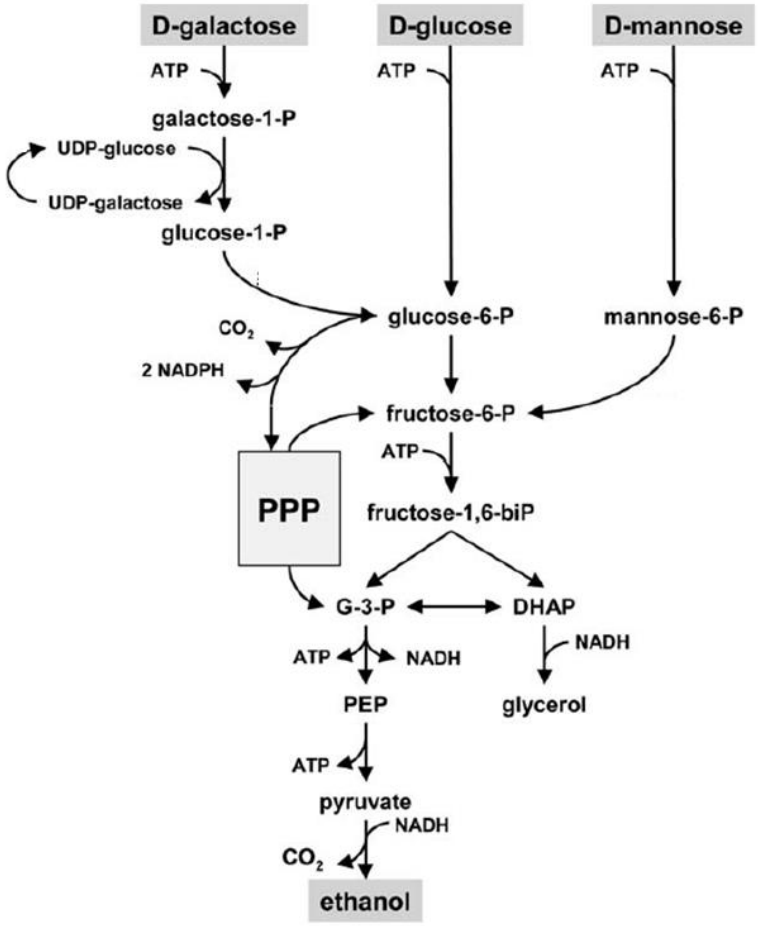


Figure 29 : Voie métabolique de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae.* G-3-P : Glyceraldehyde- 3-phosphate, DHAP : dihydroxy-acetone-phosphate, PEP : phospho-enol pyruvate; PPP : Voie des Pentoses phosphates, NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide , NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (d'après [108])

S. cerevisiae est utilisée pour l'éthanol de première génération parce qu'elle présente de nombreux avantages comparée aux autres microorganismes. Elle est tolérante à de fortes concentrations en éthanol (180 g/L) ainsi qu'en sucres et en ions, elle est robuste [112] et peut fermenter à des pH acides (3 à 4) [106]. Ce dernier point est important car beaucoup de microorganismes ne peuvent pas se développer à de tels pH. L'utilisation de *S. cerevisiae* dans de telles conditions permet ainsi de limiter le risque de contamination. Il est également possible

d'effectuer un lavage à l'acide sulfurique des levures avant de les introduire, toujours pour éviter toute contamination du milieu. De plus, la taille de la levure permet de la séparer facilement du milieu de fermentation, par filtration ou centrifugation, et ainsi de la recycler pour une nouvelle fermentation [84].
Enfin, dernier avantage non négligeable, *S. cerevisiae* est considéré comme non dangereux pour la santé humaine (organisme GRAS pour *Generally Recognized As Safe*).
L'un de ses principaux défauts est de ne fermenter que les hexoses, et non les pentoses. Il est cependant possible, par modifications génétiques, de lui faire accepter comme substrat la plupart des pentoses et hexoses (voir la partie C.2.1.2 ci-dessous).

2.1.1.2 Zymomonas mobilis

Z. mobilis est une bactérie très efficace dans la fermentation d'éthanol. La voie métabolique pour la consommation de substrat ne génère qu'une demi mole d'ATP pour une mole de substrat, ce qui entraîne une croissance plus faible que *S. cerevisiae*, et surtout une quantité plus importante de substrat allouée à la production d'éthanol [112]. Ses rendements sont donc meilleurs que ceux de *S. cerevisiae*, pouvant atteindre 97% par rapport au rendement théorique. De même, sa productivité peut être 3 à 5 fois plus importante [113], [114].
Tout comme *S. cerevisiae, Z. mobilis* tolère des concentrations relativement importantes en substrat et éthanol (120 g/L). Malgré tous ces avantages, elle ne s'est pas imposée industriellement pour différentes raisons. La première est qu'elle n'accepte comme substrat que le glucose pour produire efficacement de l'éthanol. La présence d'autres sucres, comme le saccharose, provoque même la diminution du rendement de fermentation, qui peut descendre sous les 88%, du fait de la production de sous-produits comme le sorbitol ou les lévanes [84], [106]. Elle ne peut donc pas être utilisée de manière rentable à la fermentation d'amidon ou d'hémicelluloses. Par ailleurs, son pH d'utilisation étant supérieur à 5, le risque de contamination augmente et sa petite taille rend difficile sa séparation du milieu de fermentation [84]. Enfin, elle est moins robuste que *S. cerevisiae* [112] et ne peut *a priori* pas être introduite dans l'alimentation animale [106], même si elle est classée comme GRAS. Or l'alimentation animale est un moyen efficace de valorisation des résidus de fermentation obtenus après distillation.

2.1.1.3 Escherichia coli

E. coli n'est pas à la base une bactérie pouvant produire de l'éthanol. Cependant, elle a la particularité de disposer d'une grande plasticité de son génome, qui rend les manipulations génétiques plutôt aisées. Ainsi, transformer cette bactérie afin de lui faire produire de l'éthanol fut l'une des première réussite de manipulation génétique [112]. En fonction des modifications apportées à son génome, elle présente l'avantage de pouvoir utiliser tout type de substrat, et notamment les pentoses et hexoses formant les hémicelluloses. L'injection d'oxygène dans le milieu permet de doper les rendements de fermentation du xylose [71]. Cependant, ces mêmes rendements appliqués au glucose ne dépassent pas 80% (souche K011 [71]). De plus, elle nécessite un pH compris entre 6,0 et 8,0 favorisant les contaminations, est moins robuste que *S. cerevisiae*, et n'est pas considérée comme non dangereuse (non GRAS). Des conditions particulières s'imposent donc lors de son usage. Enfin, de même que *Z. mobilis*, il n'est pas certain de pouvoir utiliser des déchets contenant *E. coli* en tant que nourriture animale [112].

2.1.1.4 Autres microorganismes

En plus des trois microorganismes présentés, il en existe de nombreux autres ayant fait l'objet d'études.
Concernant la production d'éthanol à partir d'hexoses, nombre d'autres microorganismes ont été étudiés tels que les levures *Kluyveromyces marxianus* ou *Pachysolen tannophilus*, ainsi que

les bactéries *Clostridium* (*sporogenes, indoli, sphenoides, sordelli*) et *Spirochaeta* (*aurantia, stenostrepta, litoralis*) [112].

La production d'éthanol à partir de plantes annuelles ou de feuillus, riches en pentoses, nécessite leurs fermentations. Parmi les levures pouvant naturellement fermenter les pentoses, *Pichia stipitis* est la plus étudiée [115]–[118]. Elle est capable de fermenter le xylose et le glucose en éthanol. Comme pour *E. coli*, elle présente de faibles rendements en fermentation de glucose. Il est donc préférable d'utiliser deux microorganismes pour la fermentation, l'un pour les pentoses et l'autre pour les hexoses [114]. Elle présente de plus une faible tolérance aux inhibiteurs ainsi qu'à l'éthanol (chute de rendement à partir d'une concentration de 30 à 35 g/L [114]) [119]. D'autres microorganismes fermentant les pentoses ont été étudiés, mais ils ne sont pas naturellement (sans modification génétique) plus performants que *P. stipilis*, comme *Candida shehatae, Candida novaki, Candida quercuum, Candida solani, Kluyveromyces marxianus, Pachysolen tannophilus* ou encore *Candida tropicalis* [108], [114], [120].

Enfin, un autre axe de recherche porte sur des microorganismes thermophiles, fonctionnant à des températures de l'ordre de 50—60°C. Ces températures présentent deux avantages, elles limitent les risques de contamination du milieu, et permettent d'opérer l'hydrolyse enzymatique et la fermentation simultanément (SSF, pour *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), les températures de fonctionnement des enzymes étant de cet ordre [84], [121]. *Clostridium thermocellum* [122], *Geobacillus thermoglucosidasius* [123], ou encore *Thermoanaerobacter* [124] peuvent être cités. Ces microorganismes n'ont pas de bons rendements en éthanol, celui-ci ne constituant qu'un sous-produit parmi d'autres. Il est nécessaire de les modifier génétiquement pour espérer les rendre plus efficaces [125].

2.1.2 Levures génétiquement modifiées

E. coli doit donc être modifiée génétiquement pour pouvoir produire de l'éthanol à partir d'hexoses et pentoses (notamment la souche K011 [71], [126], [127]). Le même résultat a été obtenu après modification de *S. cerevisiae* pour pouvoir fermenter les hexoses et le xylose [107], [128]. Il est même possible de faire produire des enzymes aux levures, pour effectuer la saccharification et la fermentation. *S. cerevisiae* peut ainsi non seulement fermenter hexoses et xylose, mais également hydrolyser le cellobiose [129], des hémicelluloses simples [130], ou de l'amidon [131]. Une souche d'*E. coli* a été modifiée pour hydrolyser et fermenter les xylanes [126]. Il est également possible de la rendre autofloculante, facilitant ainsi sa séparation du milieu de fermentation et son recyclage [83], [132]. L'utilisation de microorganismes génétiquement modifiés peut poser problème à l'échelle industrielle dans certains pays, dans lesquels il faut éviter toute contamination du milieu naturel avec des OGM.
Pour s'affranchir de ces contraintes, il est possible de laisser faire la nature en sélectionnant et isolant les souches les plus adaptées au milieu de fermentation (cf. la partie C.2.4 ci-dessous). Il est également possible de donner un coup de main à la nature, en irradiant d'UV des microorganismes pour accélérer les mutations, et donc créer de nouvelles souches plus rapidement [120], en espérant en obtenir de meilleures. Ce procédé est hasardeux, contrairement à la manipulation génétique, mais ses résultats ne sont pas considérés comme des OGM.

2.2 Inhibition de la fermentation

Le fonctionnement des microorganismes est directement corrélé au stress qu'il subit. Ce stress peut provenir de l'environnement (pH, température, présence d'oxygène) mais également des espèces chimiques présentes dans le milieu de fermentation. Ce dernier point marque l'une des

différences majeures entre première et deuxième génération d'éthanol. Concernant la première génération, les sucres sont obtenus directement ou par hydrolyse enzymatique. Il n'y a donc pas de sous-produits pouvant inhiber la fermentation, mis à part les sucres eux-mêmes et l'éthanol produit. En ce qui concerne la seconde génération, les hydrolyses des matériaux lignocellulosiques génèrent des sous-produits, dont la majeure partie peut inhiber la fermentation (Figure 30). Trois catégories sont considérées comme réellement problématiques, les acides organiques, les furanes et les composés phénoliques. Les ions inorganiques peuvent également y être ajoutés dans une moindre mesure [125].
L'inhibition se traduit par une durée de la phase de latence plus longue, une productivité (grammes par litres et par heure) ou des rendements plus faibles, voire l'impossibilité totale de fermenter. Réussir à fermenter de manière rentable un hydrolysat est donc l'une des clés du succès de l'éthanol de seconde génération. Plusieurs stress présentent souvent des effets de synergie.

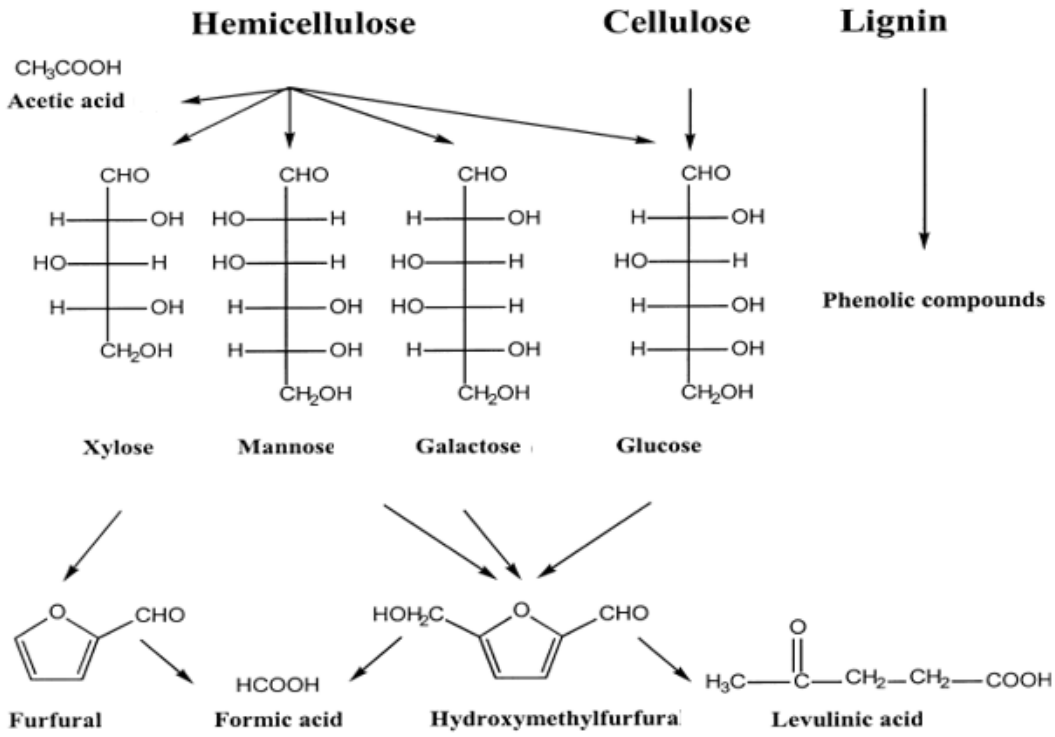


Figure 30 : Génération des inhibiteurs [133]

2.2.1 Paramètres de fermentation

La température et le pH sont des paramètres importants. La température optimale pour *S. cerevisiae* est de 30—35°C [106]. Au-delà de 38°C et en dessous de 30°C, les rendements diminuent. De plus, la fermentation étant exothermique (1,2 MJ/kg d'éthanol produit [84]), la température peut devenir problématique pour les grandes installations. Par ailleurs, une température élevée augmente le caractère inhibiteur de l'éthanol [84]
S. cerevisiae peut fermenter à un pH de 3,5 minimum [106]. Cependant, un pH supérieur à 5 est optimal, diminuant la durée de la phase de latence et permettant un développement optimal de la levure. Ceci est d'autant plus vrai quand le milieu de fermentation contient des espèces

inhibitrices [110]. Cette situation se rencontrant pour la fabrication d'éthanol de deuxième génération, il est primordial d'utiliser des gammes de températures et de pH optimales.

2.2.2 Concentrations en éthanol et en sucres

S. cerevisiae est l'un des microorganismes les plus tolérants en ce qui concerne les concentrations en sucres et éthanol. Certaines fermentations ont été menées à des concentrations initiales en glucoses de 280 g/L [134]. De même, des concentrations relativement importantes en éthanol peuvent être atteintes jusqu'à 150 g/L [106]. Cependant, le caractère toxique de l'éthanol est exacerbé par la présence d'autres inhibiteurs (acide acétique notamment), et à température élevée [106].
L'éthanol a plusieurs effets inhibiteurs sur les levures : il diminue l'activité de l'ATPase, enzyme impliquée dans le transfert d'énergie et réduit les échanges à travers la membrane [106].

2.2.3 Acide organiques

Les acides faibles sont connus pour limiter le développement de microorganismes. Ils sont d'ailleurs utilisés comme conservateurs alimentaires. *S. cerevisiae* est très sensible à la présence d'acides organiques dans le milieu de fermentation. Or, leur présence est inévitable sachant que l'hydrolyse des hémicelluloses entraine la création d'acide acétique, et que des acides formique et lévulinique peuvent être obtenus à partir de furfural et HMF, eux-mêmes provenant de la dégradation des sucres [112], comme le montre la Figure 30.
La présence de ces derniers peut cependant être évitée en limitant la sévérité des extractions.

Le mécanisme d'inhibition est le suivant : la forme indissociée des acides pénètre dans la levure au travers de la membrane. Le pH interne étant neutre, elle s'y dissocie. Deux mécanismes peuvent alors expliquer l'inhibition. D'une part, la levure utilise de l'énergie (sous forme d'ATP) pour évacuer les protons et maintenir son pH neutre. D'autre part, après évacuation des protons, les anions restants dans les cellules seraient toxiques pour la levure [133]. L'effet est différent selon la concentration en acide. A faible concentration (moins de 100 mmol/L environ quand l'acide est le seul inhibiteur), le rendement en éthanol est amélioré. La levure ayant besoin d'énergie pour maintenir son pH constant privilégie la consommation de sucre pour en produire, et synthétise donc de l'éthanol. A une concentration supérieure, elle n'arrive pas à maintenir un pH interne neutre, le rendement d'éthanol diminue, voire devient nul pour des concentrations en acide trop élevées [66].
Il est avéré que pour une même concentration molaire et un même pH, l'acide formique est plus inhibiteur que l'acide lévulinique, lui-même plus inhibiteur que l'acide acétique [135]. Un lien peut être établi avec le pKa de ces acides. Ainsi, l'acide formique (pKa de 3,75 à 25°C) a un pKa plus faible que les acides lévulinique et acétique (pKa de 4,64 à 18 °C et 4,76 à 25 °C respectivement). Il libère donc plus de protons une fois qu'il a diffusé à travers la membrane de la levure, demandant plus d'énergie à celle-ci pour maintenir son pH interne à 7. D'autres facteurs que le pKa peuvent entrer en jeu, comme la taille de la molécule ou sa capacité à être liposoluble, deux facteurs facilitant la diffusion de l'acide à travers la membrane de la cellule [66]. Le pH du milieu de fermentation a également son importance, un pH élevé diminue la proportion de la forme indissociée de l'acide [136], réduisant le pouvoir inhibant de l'acide organique. C'est pourquoi les fermentations se font à des pH de 5 ou 6 généralement avec *S. cerevisiae*, même s'il est possible de fermenter des hydrolysats à un pH de 4,0 [83].

2.2.4 Furanes

Le furfural et le HMF sont des produits de la déshydratation des sucres (pentoses et hexoses respectivement), réactions se produisant notamment pendant l'hydrolyse des hémicelluloses (Figure 30). Ces deux composés sont connus pour inhiber la fermentation. Possédant un groupement aldéhyde, ils sont néfastes pour les organismes en général. Le furfural peut par exemple endommager l'ADN des levures, ou encore inhiber certaines enzymes nécessaires à la production d'éthanol [47]. *S. cerevisiae*, en conditions anaérobiques, convertit le furfural en alcool furfurylique et le HMF en 2,5-bis-hydroxymethylfurane, espèces moins inhibitrices [133], [137], [138]. Cette réaction, concurrente de la fermentation éthanolique, entraîne une phase de latence plus longue, mobilise une partie des ressources des levures et provoque donc une diminution de la productivité en éthanol, ainsi qu'un rendement en glycérol plus faible. Cependant, pour une faible concentration en furfural, un meilleur rendement en éthanol a été observé, du fait justement de la diminution de la production de glycérol [133]. Enfin, à concentration égale, le HMF est plus inhibiteur que le furfural, celui-ci étant plus difficile à métaboliser [66].

2.2.5 Composés phénoliques

Les composés phénoliques proviennent majoritairement de fragments de lignine hydrolysée pendant le prétraitement, mais peuvent également provenir d'extraits du bois [139] ou de saccharides (catéchol de pentoses ou acide hexenuronique [135]). Le mécanisme à l'origine de leur caractère inhibiteur est encore mal connu. Ces composés pourraient s'insérer dans les membranes organiques, diminuant leur effet barrière [133]. Il existe une multitude de composés phénoliques possibles, l'évaluation du caractère inhibiteur de chacun d'entre eux est donc difficile. Cependant, certains composés sont plus récurrents, comme le catéchol, la vanilline ou l'acide 4-hydroxybenzoïque [133]. L'effet inhibiteur relatifs des groupes fonctionnels a été évalué [140]. Les groupes suivants sont classés du plus inhibiteur au moins inhibiteur : CH=CH, CHO, OH, COOH et finalement OCH_3.

Par ailleurs, vingt composants modèles ont été évalués pour des concentrations allant de 0,02 à 1 g/L avec *S. cerevisiae* [135]. Chacun des constituants, même à faible concentration, provoque une réduction de l'accroissement de la biomasse. Cependant, seuls quatre composés ont une réelle influence sur le rendement en éthanol. L'o-vanilline inhibe toute fermentation dès 0,2 g/L, alors que la vanilline seule n'a aucun impact sur le rendement. Le p-benzoquinone inhibe toute production d'éthanol, même à une concentration de 0,02 g/L. Les deux autres composés ayant une influence sur le rendement à 1 g/L sont l'acide cinnamique et l'acide 3,4-dimethoxy-cinnamique. Le catéchol n'a en revanche aucun impact seul. L'acide 4-hydroxybenzoïque, présent dans les hydrolysats de résineux, n'inhibe pas la fermentation à une concentration de 2 g/L [133].

De même que pour les furanes, il a été remarqué que *S. cerevisiae* transforme certains composés phénoliques en d'autres espèces moins toxiques [135], [139].

2.2.6 Ions inorganiques

Les ions inorganiques présents dans les hydrolysats proviennent du bois lui-même, des produits chimiques utilisés pour l'extraction des hémicelluloses et pour l'ajustement du pH. Leur présence entraine une pression osmotique sur la membrane des levures, et peut diminuer leur efficacité. Le mécanisme d'inhibition est similaire à celui des acides organiques. La levure alloue une part de son énergie à rééquilibrer la pression osmotique en évacuant les ions. Pour de faibles concentrations, l'effet est positif, la production d'éthanol étant privilégiée à la fabrication de biomasse. Mais à haute concentration, une diminution de rendement est observée [125]. *S. cerevisiae* est plutôt tolérante aux ions inorganiques [84], pouvant supporter une

concentration globale de 250 g/L [106]. Cependant, certains sels sont plus néfastes que d'autres. Les sels suivants sont classés du plus toxique au moins toxique : $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ > NaCl, NH_4Cl > KH_2PO_4 > $MgCl_2$ > $MgSO_4$ > KCl [141]. Ainsi, l'addition de plus de 60 g/L de NaCl annule toute croissance des levures [110].
L'influence de ces ions est à prendre en compte pour le choix des produits chimiques utilisés en amont de la fermentation.

2.3 Procédés réduisant l'impact des inhibiteurs

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour limiter l'effet des inhibiteurs lors de la fermentation. Ces derniers résultant de la phase d'extraction des hémicelluloses, l'optimisation de celle-ci peut permettre de réduire la quantité d'inhibiteurs, en utilisant un traitement moins sévère par exemple. Il faut parfois limiter la quantité de sucres extraite, pour finalement obtenir une production plus importante d'éthanol grâce à de meilleurs rendements de fermentation. Il est également possible de détoxifier l'hydrolysat en amont de la fermentation, de travailler sur les levures pour augmenter leur tolérance, ou de choisir un procédé de fermentation judicieux.

2.3.1 Les procédés de détoxification

Il existe plusieurs traitements pouvant détoxifier un hydrolysat. Le choix du traitement dépend des composés inhibiteurs à éliminer, ainsi que de données économiques.
Le procédé alcalin, ou *overliming*, est un procédé qui consiste à augmenter le pH de l'hydrolysat jusqu'à obtenir un précipité. Une fois ce précipité éliminé (filtration, centrifugation…), le pH peut de nouveau être ajusté pour la fermentation [142]. Ce procédé permet de réduire les teneurs en furanes et composés phénoliques, mais n'a aucun impact positif sur les acides organiques. L'*overliming* était à l'origine effectué à partir d'hydroxyde de calcium, ou chaux éteinte ($Ca(OH)_2$), d'où le nom (*lime* signifiant chaux en anglais). Un précipité de sulfate de calcium (gypse, $CaSO_4$) se forme pendant le traitement, sous-produit qu'il faut valoriser. L'*overliming* désigne dorénavant tout traitement alcalin de détoxification, qui peut être effectué également avec de l'ammoniaque (NH_4OH), de l'hydroxyde de magnésium ($Mg(OH)_2$), de l'hydroxyde de barium ($Ba(OH)_2$), ou de la soude (NaOH) [139], [143], [144].

L'utilisation de résines échangeuses d'anions permet de purifier l'hydrolysat de la plupart de ses inhibiteurs. Effectué sur un hydrolysat acide de bagasse de canne à sucre, il a par exemple permis d'éliminer 63,4% des furanes, 75,8% des composés phénoliques et 85,2% de l'acide acétique [145], [146].

Le procédé aux charbons actifs consiste à mettre en contact l'hydrolysat et des charbons actifs. Ce procédé, utilisé pour éliminer les composés phénoliques [147], a montré également une aptitude à diminuer les concentrations en furanes et acide acétique. Le charbon peut être régénéré, en le mettant par exemple quelques heures dans de l'eau bouillante [148].

L'évaporation d'un hydrolysat permet d'éliminer certains inhibiteurs, tout en augmentant sa concentration en sucres, ce qui peut parfois être utile (cf. la partie C.2.6 ci-dessous). L'évaporation permet d'éliminer les acides acétique et formique, et le furfural. [146], [148]. Cependant, les inhibiteurs qui n'ont pas été extraits sont également concentrés.

Des enzymes peuvent être utilisées pour transformer les composés inhibiteurs en composés moins toxiques pour les levures. Les plus utilisées sont les laccases. Celles-ci permettent

d'éliminer les composés phénoliques, *a priori* en les faisant polymériser [142], mais n'a pas d'effet sur les autres inhibiteurs [146].

Il est possible d'utiliser des microorganismes pour détoxifier des hydrolysats. Ils peuvent produire des laccases, comme *Trametes versicolor* [142] ou de *Cyathus stercoreus* [145].
D'autres microorganismes peuvent avoir un comportement similaire à *S. cerevisiae*, en transformant HMF et furfural en 2,5-bis-hydroxymethylfuran et alcool furfurylique [47].

Certains produits chimiques, ajoutés dans un milieu de fermentation inhibé, ont la capacité d'augmenter les rendements de fermentation en diminuant la nocivité des inhibiteurs. L'ajout de dithionite ($S_2O_4^{2-}$) à 5 et 10 mM a permis d'améliorer les rendements de fermentation d'un hydrolysat [149], bénéficiant du pouvoir oxydant de cet anion. Le sulfite, déjà évoqué lors du traitement alcali (cf. la partie B.2.1 de ce chapitre), possède la même propriété.
Certains composés peuvent directement agir sur la levure, comme le tréhalose, qui protège la membrane, ou la glutathione [47].

L'efficacité des procédés de détoxification sur les inhibiteurs est résumée dans le Tableau 13. De plus, une étude plus complète de ces différents procédés est disponible dans l'annexe I.

Traitement	HMF	Furfural	Acide acétique	Acide formique	Acide lév.	Composés phénoliques	Dégradation des sucres
Alcalin ($Ca(OH)_2$)	++	++	-	-	0	+	++
Alcalin (NH_4OH)	+++	+++				++	+
Alcalin (NaOH)	+	+	0	0		+	+
Résines	+	+	+++	+++	+++	+++	+
Charbons actifs	+	++	+		+++	+	
Evaporation	+	+++	++	++			0
Laccases	0	0	0	0	0	+++	0
T. reessei	+	++	0	0	0	0	
A. resinae	++	++	++	++			

Tableau 13 : Effets relatifs des différents procédés de détoxification sur les inhibiteurs [47], [139], [142]–[149]

2.3.2 Modifications génétiques

Le génie génétique peut permettre d'éviter l'implantation d'une étape de détoxification. Des souches hypertolérantes de *S. cerevisiae* ont démontrées une meilleurs aptitude à la fermentation en présence de composés phénoliques et de HMF [150] ou aux furanes en général [47].

2.4 Acclimatation des microorganismes

L'acclimatation d'un microorganisme est un procédé induisant une tolérance sans modification génétique. Pour l'acclimater, il est successivement plongé dans un milieu contenant une proportion de plus en plus importante de la solution à fermenter (l'hydrolysat dans le cas de cette thèse). Il est possible, entre chaque étape, de procéder à une sélection afin d'isoler le microorganisme le plus adapté. Pour cela, les levures sont placées dans une boite de Petri qui contient l'hydrolysat en même proportion que le milieu d'où a été extraite la levure, afin d'avoir

le même degré d'inhibition. Après quelques jours, les colonies les plus développées, donc les plus adaptées au milieu, sont sélectionnées pour procéder à l'étape suivante d'acclimatation [151]. Des levures incapables de fermenter un hydrolysat sont devenues efficaces après ce type de procédé [83]. Une levure adaptée démontre en effet une meilleure aptitude à se développer, ainsi qu'une phase de latence plus courte [110].
Les levures possèdent donc une capacité à s'adapter rapidement à un environnement, même si la différence entre deux environnements doit être limitée, d'où un procédé qui se fait étape par étape. Cette adaptation du métabolisme est temporaire. Pour obtenir des modifications permanentes, il est nécessaire d'élever les levures dans un milieu inhibé sur le long terme. Dans ce cas, une sélection « naturelle » s'opère, les organismes les mieux adaptés s'imposant par rapport aux autres. Des levures obtenues après environ 300 générations ont montré des capacités bien meilleures que leurs « ancêtres », montrant des phases de latences plus courtes, ou des rendement de dégradation du furfural et du HMF plus élevés [47].

2.5 Procédés de fermentation

Il est possible d'effectuer les fermentations en *batch* (discontinu), *fed-batch* (semi-continu) ou en continu.
Le mode *batch* est le plus simple à utiliser. Le temps de séjour peut être adapté à la fermentation, et les contaminations bactériennes éventuelles sont plus faciles à gérer que lors d'une fermentation continue. Cependant, l'efficacité d'un procédé discontinu n'est pas optimale, étant donné les pertes de temps entre deux fermentations.
Le mode *fed-batch* est relativement similaire au procédé *batch*, si ce n'est que l'alimentation est effectuée graduellement. L'avantage de ce procédé est que les effets inhibiteurs de l'éthanol, des sucres fermentescibles et des furanes sont amoindris. En effet, ils sont dilués au fur et à mesure de la fermentation par l'apport d'hydrolysat Ainsi, les furanes, à faible concentration, sont éliminés plus facilement par les levures [47], [142].
Le mode continu est le procédé le plus utilisé pour la fabrication d'éthanol. Il consiste généralement en une cascade de fermenteurs (Figure 31) [152]–[154]. Ce procédé présente divers avantages. Tout d'abord, la gestion des inhibiteurs est similaires au procédé *fed-batch*. De plus, l'utilisation d'un mode continu permet un dimensionnement des équipements annexes plus rentable et une gestion plus simple du procédé. Enfin, de meilleures productivités sont observées pendant les fermentations continues que pendant une fermentation batch [84], [142], et le risque de contamination est réduit [155].

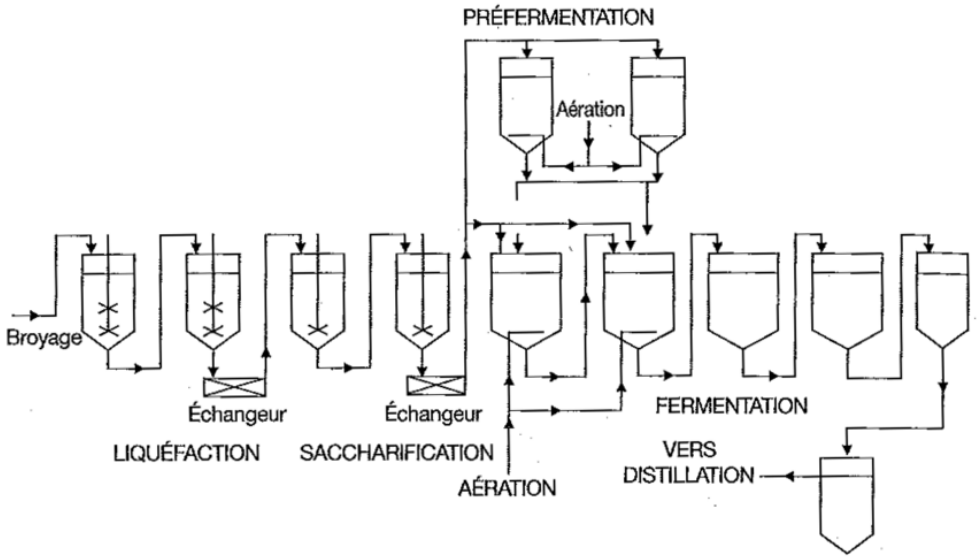


Figure 31 : Schéma d'un procédé de fermentation en continu [84]

Lors d'un procédé continu, le concept de taux de dilution (en h^{-1}, qui correspond au rapport entre le débit volumique et le volume du fermenteur) est privilégié par rapport au temps de séjour. Ce taux de dilution doit être équivalent au taux de croissance spécifique de la biomasse, pour maintenir la concentration de levures constante [142]. Dans ce cas, la biomasse est « cultivée » en amont du procédé, en utilisant une partie de la solution à fermenter (l'hydrolysat dans le cadre de cette étude). Il est néanmoins envisageable d'utiliser des procédés permettant de recycler les levures ou de les conserver dans les fermenteurs en les immobilisant.

Le recyclage consiste à récupérer les levures à la fin du procédé, par centrifugation, filtration ou décantation, puis à les réinjecter dans les fermenteurs [142]. Ce procédé est plus efficace si les levures sont les seules particules en suspension dans le milieu [84]. L'usage de levure flocculantes est également un atout. Le recyclage de 90 % des levures permet d'utiliser des levures acclimatées au milieu, ce qui a pour effet de multiplier la productivité en éthanol de 3 à 4,6 fois ([156], [157]), ou de faire progresser à la fois la consommation en sucres fermentescibles de 92 à 99% et la métabolisation des furanes [158]. La centrifugation est préconisée par rapport à la filtration, car cette dernière peut rapidement perdre en efficacité si l'hydrolysat est chargé en matières solides [142]. Par ailleurs, la décantation permet de recycler une quantité plus importante de levures, pouvant entrainer des rendements en éthanol plus élevés que lors de séparations par filtration ou centrifugation [159]. Il faut toutefois noter qu'une concentration trop importante en biomasse peut avoir un effet négatif sur les rendements en éthanol [142], [158]. Le taux de recyclage est donc un paramètre à ajuster soigneusement.

Une solution alternative au recyclage est d'immobiliser les levures dans les fermenteurs. Des perles d'alginate de calcium ou de sodium contenant les levures sont créées à cette fin [160], [161]. Même si l'immobilisation devrait en théorie limiter la production d'éthanol [106], des hausses de rendement et de productivité ont été observées [159], [162]. Des particules magnétiques peuvent également être ajoutées, pour "piéger" les perles dans un champ magnétique, ce qui permet d'obtenir un rendement en éthanol de 99,3% [161]. En dépit de ces bons résultats, la durée de vie des perles peut poser problème. Du calcium doit être injecté pour

les préserver (cas d'alginate de calcium). Les rendements décroissent cependant avec le temps, à mesure que les levures vieillissent [162].

2.5.1 Saccharifications et fermentations simultanées

L'éthanol de première génération à partir d'amidon, tout comme l'éthanol de seconde génération, nécessitent un procédé de saccharification avant la fermentation (SHF pour *Separated Hydrolysis and Fermentation*) Toutefois, ces traitements peuvent être effectuées ensemble, dans le cadre d'une SSF (pour *Simultaneous Saccharification and Fermentation*).
Dans le cadre de l'éthanol cellulosique, et hémicellulosique d'autres terminologies sont employées selon le procédé utilisé. Après un premier prétraitement, une phase liquide contenant les hémicelluloses et une autre contenant cellulose et lignine son obtenues. La cellulose et les hémicellulose doivent encore être convertie en monomères avant d'être fermentée (SSF si la saccharification et la fermentation sont effectuées en même temps). Si les hémicelluloses sont hydrolysées à part, puis fermentées avec la cellulose, il s'agit de SHCF (*Separate Hydrolysis and Co-Fermentation)*. Si les hémicelluloses et la cellulose sont hydrolysées et fermentées ensemble, il s'agit alors de SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*). Enfin, si les enzymes pour effectuer ce dernier procédé sont fabriquées *in situ*, il s'agit de CBP (*Consolidated Bioprocessing*). Dans ce cas, le traitement est entièrement organique, utilisant un ou des microorganisme(s) pour effectuer l'hydrolyse et la fermentation. La Figure 32 présente ces différents cas de figure.

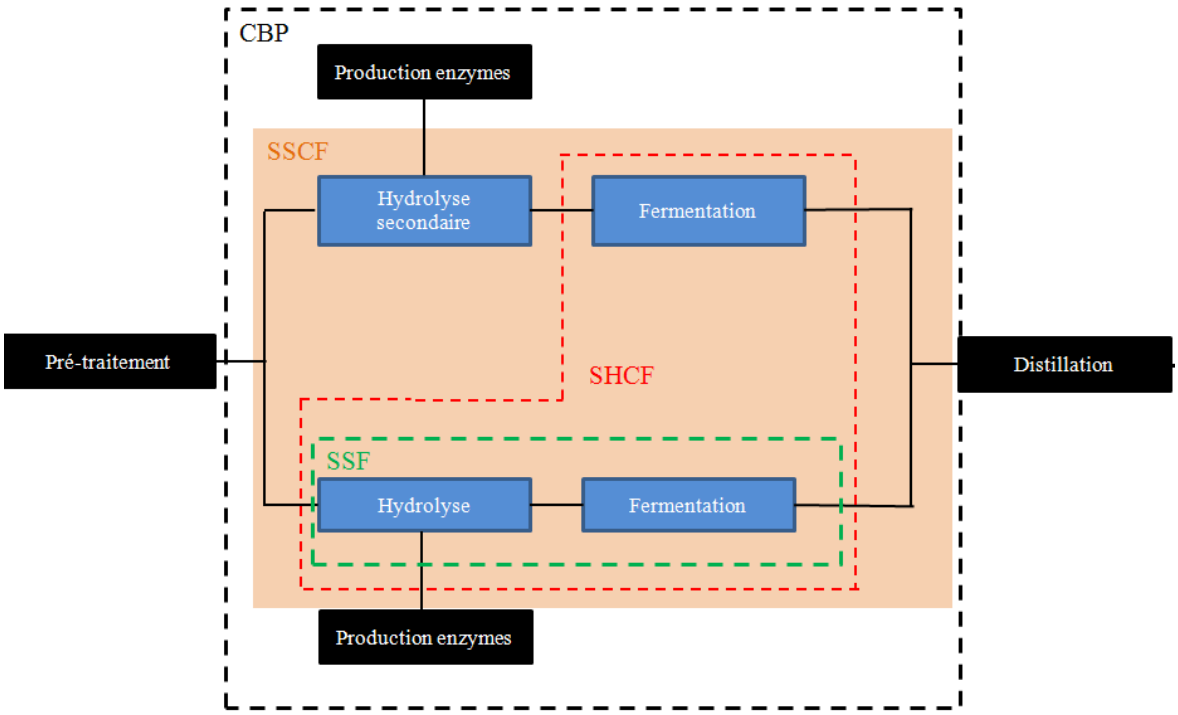


Figure 32 : Schéma représentant les différents procédés combinés de saccharification et fermentation (adapté de [7])

L'intérêt de tels procédés est économique, avec la réduction des étapes dans le procédé, mais également pratique, permettant de diminuer l'inhibition des levures et des enzymes due aux

sucres, dont la concentration reste limitée, puisqu'elles sont fermentées dès leur apparition [124].
Le seul procédé de saccharification éligible pour être mené pendant une fermentation est l'hydrolyse enzymatique. Les températures et pH des autres procédés sont en effet incompatibles avec une fermentation. La SSF est donc plutôt adaptée à l'éthanol produit à partir d'amidon ou de cellulose, l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses étant encore loin d'être efficace (cf. la partie B.3.4 de ce chapitre). SSSF et CTB sont encore hypothétiques. Toutefois, des recherches sont effectuées sur des organismes OGM pouvant produire à la fois des enzymes (cellulases et hémicellulases) et fermenter les sucres (pentoses et hexoses). Une nouvelle souche de bactérie *E. coli* a permis d'hydrolyser et fermenter des xylanes jusqu'à obtenir un rendement d'éthanol de 70%, par rapport aux xylanes présents en début de procédé [126]. Rien n'interdit d'imaginer dans le futur un ou des microorganismes utilisés conjointement capables d'hydrolyser et fermenter des GGM.
Les températures optimales de fonctionnement des enzymes et des levures ne sont généralement pas similaires, sauf en cas d'utilisation de levures thermophiles. Les SSF sont généralement effectuées aux alentours de 37°C, température représentant un bon compromis. Un autre problème est l'inhibition, qui n'est plus dévolue aux seules levures, mais également aux enzymes. Ces dernières sont notamment inhibées par la lignine et ses dérivés [48]. Cependant, que ce soit sur des composés modèles [163], [164] ou des hydrolysats destinés à la fermentation des hémicelluloses et de la cellulose, de bons résultats sont obtenus. Des rendements de 81%, par rapport à l'ensemble des sucres fermentescibles, ont été rapportés [48], [165]. Les rendements sont mêmes apparus meilleurs que lors d'un procédé en deux étapes distinctes.

2.6 L'extraction de l'éthanol

L'obtention d'éthanol pur est indispensable pour l'utilisation en tant que carburant. Les procédés d'extraction sont de nos jours efficaces et rentables, ceux-ci étant utilisés depuis de nombreuses années. Cependant, leur impact sur la rentabilité du procédé est très important.
L'éthanol et l'eau composent un azéotrope quand est atteinte une concentration en éthanol de 95,6%(w/w). Sa température d'ébullition à pression atmosphérique est alors de 78,2°C, pour 79°C concernant l'éthanol. Il est possible d'obtenir de l'éthanol pur en effectuant une distillation à une pression de 0,11 atmosphères [147], mais ce procédé est trop coûteux. Il est préférable d'effectuer deux étapes d'extraction.

Une première distillation classique est effectuée pour obtenir un mélange proche de la proportion azéotropique. Plusieurs solutions existent ensuite pour déshydrater ce mélange, la distillation azéotropique, la distillation extractive, la séparation sur tamis moléculaire ou la pervaporation.
Une distillation azéotropique consiste à introduire un solvant entraineur qui va former un azéotrope ternaire dont la température d'ébullition est inférieure à l'azéotrope eau-éthanol (voir schéma Figure 33). La distillation de cet azéotrope ternaire va permettre d'obtenir de l'éthanol pur à plus de 99% en bas de colonne. Le distillat, contenant eau, éthanol et solvant extracteur, est divisé en deux phases par décantation. La phase contenant l'éthanol est renvoyée à la colonne de distillation azéotropique, la phase aqueuse subit une nouvelle distillation afin de séparer l'eau du solvant extracteur. Les solvants employés sont le cyclohexane, le diéthylether, le n-pentane, le benzène et le toluène [84], [147]. Ces deux derniers ne sont plus guère utilisés, du fait de leur toxicité, le cyclohexane étant privilégié (voir [166] pour les données concernant l'azéotrope eau-éthanol-cyclohexane).
Ce procédé est très coûteux en énergie. La consommation énergétique totale de l'extraction d'éthanol, à partir d'une concentration de 10% (v/v) est évaluée, selon la technologie, entre 6 et 9 MJ/kg d'éthanol, soit un quart à un tiers du pouvoir calorifique de l'éthanol [84]. Ce constat,

associé à l'utilisation de solvants dangereux font que la distillation azéotropique est en perte de vitesse au profit d'autres technologies.

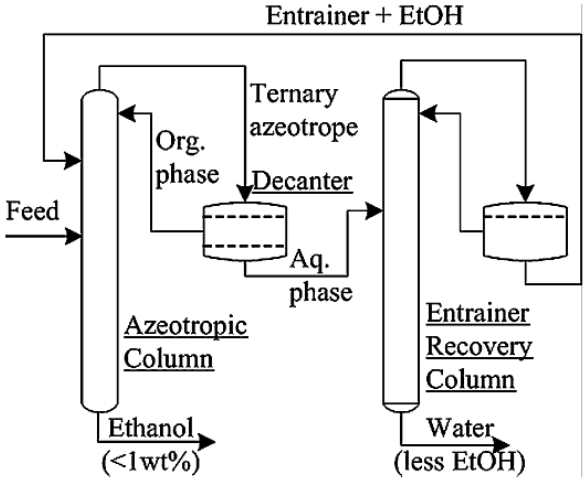


Figure 33 : Schéma d'une distillation azéotropique [147]

.La distillation extractive est une distillation effectuée avec un troisième constituant qui a le pouvoir d'inverser les températures relatives d'ébullition du mélange. Ainsi, la température d'ébullition de l'azéotrope n'est plus la plus faible. Ce troisième constituant peut être un liquide (l'éthylène glycol par exemple, ou l'essence en cas de production de carburant), un sel (acétate de potassium, acétate de sodium…), un liquide ionique ou des polymères [147]. Une étape annexe est ici aussi nécessaire pour recycler le constituant ajouté.

Le procédé qui s'impose de plus en plus est la séparation sur tamis moléculaire. [84]. Il s'agit d'un tamis composés de zéolites, dont les pores ont un diamètre nominal de 0,30 nm. Les molécules d'éthanol (approximativement 0,44 nm de diamètre) sont retenues par ce tamis, alors que les molécules d'eau (0,28 nm de diamètre), plus petites, peuvent pénétrer les pores [147]. Cette technologie présente un excellent bilan énergétique de 0,1 à 0,2 MJ/kg d'éthanol pour une consommation totale (avec la première distillation) de 5 MJ/kg d'éthanol.

La séparation eau-éthanol peut également s'effectuer par des membranes par pervaporation. Des membranes hydrophiles ou hydrophobes existent. Ce procédé peut également être utilisé pendant le fermentation pour extraire l'éthanol en continu, et limiter ainsi son pouvoir inhibiteur [167].

La consommation d'énergie de ces procédés risque de représenter une difficulté majeure pour la production rentable d'éthanol de seconde génération lorsque les procédés utilisés pour extraire et hydrolyser les sucres conduisent à des solutions relativement diluées en sucre. Cela sera notamment le cas pour les procédés d'autohydrolyse ou d'hydrolyse acide du bois qui seront utilisés dans cette étude pour extraire les hémicelluloses. La consommation énergétique de la distillation suit une loi exponentielle avec la quantité d'eau à retirer, comme le montre la Figure 34. Ainsi, selon les sources, pour espérer avoir un procédé global rentable, la concentration minimale d'éthanol avant distillation doit être comprise entre 3%(v/v) [168] et 5%(v/v) [60]. Cela signifie des concentrations en sucres fermentescibles avant fermentation comprises entre 65 et 110 g/L. Or, les concentrations obtenues après les prétraitements sont loin de ces valeurs (cf. la partie B.3 de ce chapitre). Un travail doit être effectué sur ce point, pour

augmenter les teneurs en sucres. Plusieurs études ont été effectuées sur l'évaporation ou la filtration membranaire [71], mais peu ont cherché à maximiser les concentrations pendant le stade d'extraction.

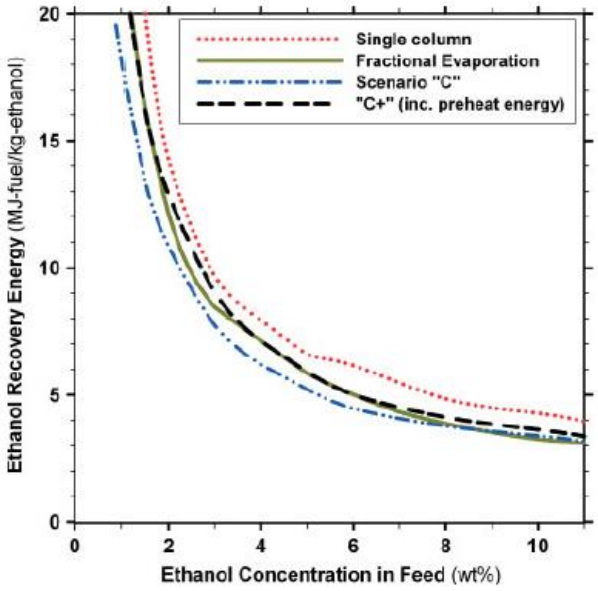


Figure 34 : Energie requise pour la distillation d'éthanol selon différentes technologies [168]

D. Conclusion

La production de bioéthanol de seconde génération dans une usine kraft est un défi. Différents procédés d'extraction des hémicelluloses sont envisageables. Les procédés alcalins n'autorisent qu'une faible extraction des hémicelluloses, mais préservent la cellulose et les fibres. L'autohydrolyse et les hydrolyses acides permettent d'extraire plus d'hémicelluloses, mais entraînent l'apparition d'espèces connues pour inhiber la fermentation.

Le choix du procédé d'extraction est primordial. Un traitement relativement sévère permettant une forte production d'éthanol, mais nécessitant des stades de détoxifications peut s'avérer moins judicieux qu'un traitement modéré produisant moins d'éthanol, mais permettant d'optimiser la fermentation en limitant les inhibiteurs. De plus, un traitement modéré dégradera certainement moins la cellulose qui sera produite à partir de ces copeaux.

L'étude d'un procédé global, allant du choix du prétraitement jusqu'à la fermentation d'éthanol, n'a jamais été réalisée. Il est proposé de la faire dans cette étude à partir de copeaux de bois de résineux. Dans une première partie, les différents prétraitements envisagés, alcalins comme acides, seront étudiés et comparés. L'aptitude des hydrolysats obtenus à être fermentés sera analysée dans une seconde partie. L'accent sera mis en particulier sur l'effet des inhibiteurs de fermentation. Ces deux études devraient permettre de déterminer les procédés d'extraction les plus prometteurs.

Enfin, une troisième partie sera consacrée à l'implémentation de ces traitements dans une usine de production de cellulose. L'accent sera notamment porté sur la maximisation des concentrations en saccharides avant fermentation, dans le but de réduire les coûts énergétiques de la distillation.

Chapitre II : Extraction des hémicelluloses

Ce chapitre traite de l'extraction des hémicelluloses du bois. L'efficacité de différents procédés sera évaluée, tant au niveau de la quantité de saccharides extraite que des teneurs en espèces inhibitrices contenues dans les hydrolysats. Le cas de l'autohydrolyse sera étudié avec plus d'intérêt, en optimisant l'hydrolyse secondaire indispensable à la dépolymérisation des oligomères. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'augmentation de la teneur en saccharides des hydrolysats, que ce soit par évaporation ou pendant le procédé d'extraction lui-même, en diminuant le ratio L/B ou en recyclant l'hydrolysat lors de plusieurs extractions en série.

A. Composition du bois

Le bois utilisé provient d'un lot de copeaux gracieusement fourni par l'usine de pâte Fibres Excellence de Tarascon. Cette usine utilise comme matière première du résineux provenant de plusieurs espèces dont la composition moyenne est la suivante : 35% de Pin Sylvestre, 24% de Pin Noir, 18% de pin d'Alep, 16% d'Epicéa et 7% de sapin de Douglas. La siccité des copeaux était de 55%. Il a paru important dans le cadre de cette thèse de se servir de copeaux utilisés industriellement pour pouvoir transposer au mieux les résultats obtenus à une utilisation à grande échelle. Les copeaux utilisés sont donc de taille variable. Cependant, les plus gros d'entre eux ainsi que les morceaux d'écorce ayant échappés à l'étape d'écorçage ont été éliminés pour ne pas fausser les résultats.

La composition du bois a été mesurée selon les normes TAPPI T 249 cm-00 pour les saccharides, TAPPI T 222 om-88 pour la lignine klason et TAPPI UM 250 pour la lignine soluble (Tableau 14). Les mesures ont été effectuées cinq fois. Ces chiffres sont cohérents avec les compositions de résineux connues, notamment le pin sylvestre et l'épicéa (cf. chapitre I, partie A.1). Les teneurs en mannanes et en groupements acétyles sont toutefois comprises dans la fourchette basse. A partir de ces données, il est possible de calculer les teneurs en cellulose, GGM et xylanes (Tableau 15) selon les formules données dans le chapitre IV, partie B.4 d'après Janson [169]. Pour ce faire, les ratios entres unités monomériques dans les GGM et xylanes doivent être fixés. Les valeurs typiques rencontrées pour le pin sylvestre et l'épicéa ont été choisies. Les compositions en GGM, xylanes et lignine peuvent être comparées avec celles du pin sylvestre, de l'épicéa commun et du sapin de Douglas, espèces entrant dans la composition du bois utilisé dans cette étude.

	Moyenne
Arabinanes	2,0 ± 0,2
Galactanes	2,1 ± 0,0
Glucanes	40,0 ± 0,5
Xylanes	4,90 ± 0,6
Mannanes	10,1 ± 0,2
Groupes acétyles	1,3 ± 0,01
Lignine	27,9 ± 0,5
Lignine soluble	0,35 ± 0,02
Extractibles à l'acétone	2,5 ± 0,5
Autre*	8,9
Somme pentosanes	6,9 ± 0,7
Somme hexosanes	52,1 ± 0,7
Total saccharides	59,0 ± 1,4

Tableau 14 : Composition chimique du bois sec sans écorce (%) * calculé par différence, comprend les acides uroniques, les cendres, et les autres extractibles

	Bois utilisé	Pin sylvestre	Epicéa commun	Sapin Douglas
Cellulose	37,7—38,5	40	41,7	38,8
GGM	16,0—18,5	16,0	16,3	17,5
Xylanes	5,5—7,0	8,9	8,6	5,4
Autres polysaccharides	0,8—3,7	3,6	3,4	3,4
Lignine	28,3	27,7	27,4	29,3

Tableau 15 : Composition chimique de bois sec utilisé (gramme pour 100 g de bois sec écorcé), et comparaison avec celle d'espèces de résineux (d'après [3]). Les variations dépendent des ratios entre unités choisis pour définir les GGM et les xylanes. Les xylanes mesurés ne prennent pas en compte les groupements 4-O-methylglucuroniques, contrairement aux valeurs des espèces de résineux pures.

B. Prétraitements

Les effets de différents prétraitements ont été évalués sur le bois de départ. Des autohydrolyses et des hydrolyses avec ajout d'acide sulfurique (appelées ici hydrolyses acides) ont été effectuées avec des paramètres sélectionnés suite à des essais antérieurs effectués sur le même type de biomasse [12], [57], [170]. Des extractions alcalines et des extractions en milieu quasi-neutre (NNE) ont été menées avec des intensités choisies selon la littérature [73], [77], [78]. Enfin, des *Cold Caustic Extraction* (CCE) ont été essayées sur des copeaux.
Le but était de comparer le potentiel de ces traitements pour l'obtention de saccharides en solution, en partant de paramètres optimisés dans la littérature.

1 Autohydrolyse et hydrolyse acide

Des travaux antérieurs effectués avec le même type de matière première ont permis d'optimiser l'autohydrolyse et l'hydrolyse acide. Il a été déterminé qu'une température d'au moins 150—160°C est nécessaire à l'extraction des hémicelluloses [57]. Les paramètres permettant d'extraire un maximum de saccharides tout en limitant leur dégradation en inhibiteurs de la fermentation ont été sélectionnés pour deux autohydrolyses et une hydrolyse acide. Ces traitements sont ainsi relativement doux, au risque de ne pas extraire la totalité des hémicelluloses et de ne pas les dépolymériser. Ces paramètres sont résumés dans la Tableau 16. Le ratio L/B a été ajusté à 4, ce qui correspond au ratio utilisé habituellement pendant une cuisson kraft. L'unique différence entre l'autohydrolyse à 160°C (appelée autohydrolyse 160) et l'hydrolyse acide est l'ajout d'acide sulfurique (1 g pour 100 g de bois). L'autohydrolyse à 170°C (autohydrolyse 170) devrait donner des résultats similaires à l'autohydrolyse à 160°C, mais avec une durée plus courte, et un temps de montée en température minimal. Dans le Tableau 16 sont également indiqués les facteurs H, P et de sévérité combinée CS, afin de comparer ces extractions entre elles, ainsi qu'à d'autres dans la littérature. Les facteurs H et P définissent la sévérité du traitement à partir du profil de température du traitement. Le facteur H est plus adapté ici, puisqu'il est défini pour l'hydrolyse des GGM, alors que le facteur P est quant à lui défini pour l'hydrolyse des xylanes. Le facteur de sévérité combinée CS prend également en compte le pH final de d'hydrolysat. Le calcul de ces facteurs est évoqué dans le chapitre I, partie B.2.1. Parmi les deux autohydrolyses, l'hydrolyse 170 paraît donc comme celle ayant la plus haute sévérité. Par rapport à l'hydrolyse 160, son temps plus court est compensé par une température légèrement plus élevée.

	Température (°C)	Durée (min)[1]	H_2SO_4	L/B	facteur H	facteur P	CS
Autohydrolyse 160	160	90-120-30	-	4	870	600	0,35
Autohydrolyse 170	170	30-65-30	-	4	980	640	0,38
Hydrolyse acide	160	90-120-30	1%/ bois	4	870	600	2,35

Tableau 16 : Conditions des autohydrolyses et de l'hydrolyse acide ; [1]durée de montée en température-durée à température-durée de descente en température

1.1 Caractéristiques de l'hydrolysat

Les concentrations en saccharides mesurées dans les hydrolysats sont visibles sur les Figures 35 à 37. Les résultats sont sensiblement proches concernant les autohydrolyses, avec 24,6 ± 1,1 et 23,0 ± 1,0 g/L d'hexoses solubilisés pour les autohydrolyses 160 et 170 respectivement. Au total, 34,6 ± 1,8 g/L et 30,1 ± 1,6 g/L de saccharides se retrouvent en solution. En revanche, l'hydrolyse n'est pas suffisamment sévère pour permettre de dépolymériser totalement les hémicelluloses. Les taux de monomères sont de 64,7 ± 8,9% et 14,5 ± 1,3% pour les pentoses et les hexoses respectivement concernant l'hydrolyse 160. Ces même taux concernant l'autohydrolyse 170 sont de 61,0% ± 8,4% et 9,7% ± 0,9%. Des résultats similaires ont déjà été observés, jusqu'à obtenir une dépolymérisation totale des pentose [50]. L'hydrolyse de la majorité des pentoses est en effet plus rapide que celle des hexoses.

Concernant l'hydrolyse acide, une quantité plus importante en saccharides a été mesurée en solution, avec une concentration en hexoses de 33,9 ± 1,4 g/L (44,9 ± 2,3 g/L de saccharides au total). De plus, les taux de monomères atteignent 83,2 ± 13,3% et 89,2 ± 13,3% concernant les pentoses et les hexoses respectivement, ce qui s'explique par l'action catalytique de l'acide

ajouté. Ces taux de monomères sont typiques d'une hydrolyse acide [57]. Cela permettra de fermenter directement les hydrolysats acides, alors qu'une seconde étape d'hydrolyse sera nécessaire pour les hydrolysats issus d'une autohydrolyse qui contiennent majoritairement des oligomères.

Les ratios $\frac{mannose}{glucose}$ calculés à partir des concentrations des monomères et des oligomères dans les hydrolysats sont de 3,7 pour les autohydrolyses et de 2,4 pour l'hydrolyse acide. Cette dernière entraine donc une extraction plus importante de glucose comparée au mannose, ce qui suggère qu'une partie de ce glucose proviendrait de la cellulose. L'hydrolyse acide semble donc dégrader plus fortement la cellulose que l'autohydrolyse.

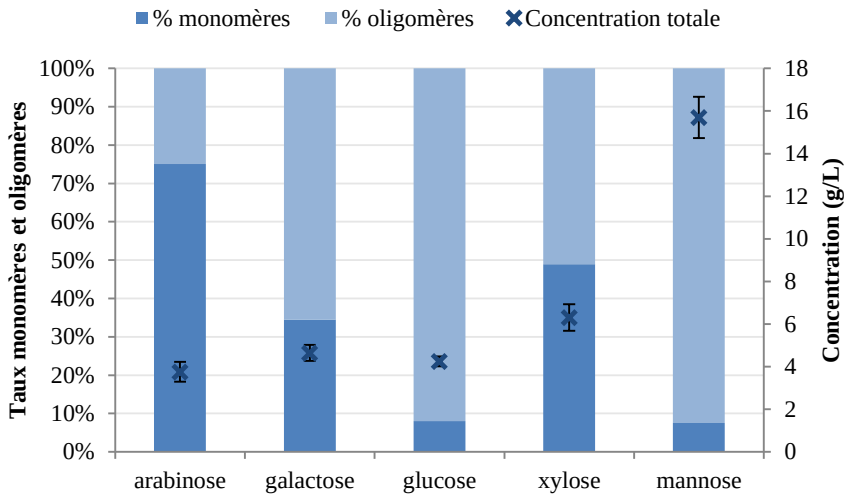


Figure 35 : Concentrations en saccharides et proportions monomère/oligomère mesurées dans un hydrolysat après l'autohydrolyse 160

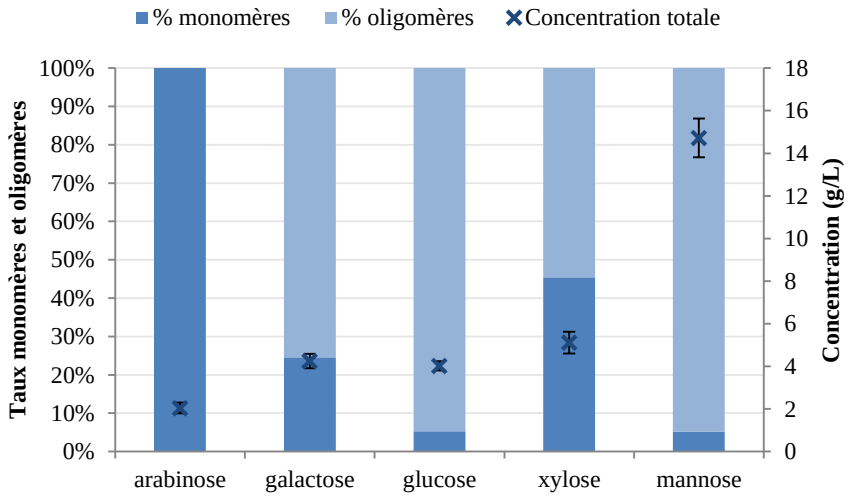


Figure 36 : Concentrations en saccharides et proportions monomère/oligomère mesurées dans un hydrolysat après l'autohydrolyse 170

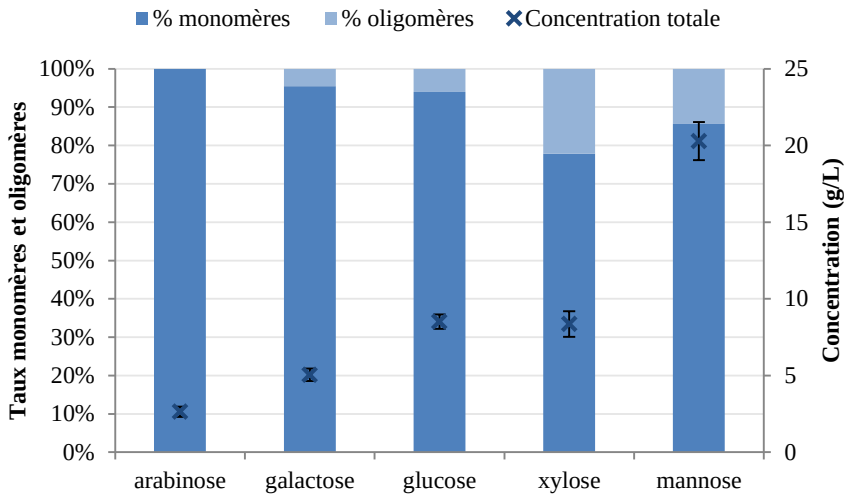


Figure 37 : Concentrations en saccharides et proportions monomère/oligomère mesurées dans un hydrolysat après une hydrolyse avec ajout d'acide sulfurique

Les concentrations en espèces inhibitrices présentes dans les hydrolysats sont visibles sur la Figure 38. La présence de ces espèces doit être limitée autant que possible avant une fermentation.

L'apparition d'acide acétique, provenant de la désacétylation des hémicelluloses, est inéluctable. Se présence est même indispensable pour acidifier le milieu et solubiliser les hémicelluloses lors des autohydrolyses. Cependant, trois à quatre fois moins d'acide acétique est relevé pour les autohydrolyses comparé à l'hydrolyse acide. La présence de HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique est due à la dégradation des saccharides en cas de traitement sévère. Celle-ci est relativement limitée concernant les autohydrolyses, mais beaucoup plus prononcée en ce qui concerne l'hydrolyse acide avec des concentrations en furanes et acide formique supérieures à 2,7 g/L, ainsi que la présence d'acide lévulinique. Ce niveau de concentration a déjà été mesuré pour des hydrolyses de cette sévérité [66]. La présence d'acide formique est également constatée concernant l'autohydrolyse. L'apparition de cette espèce est rarement mentionnée dans la littérature lors d'un traitement sans ajout d'acide [171].

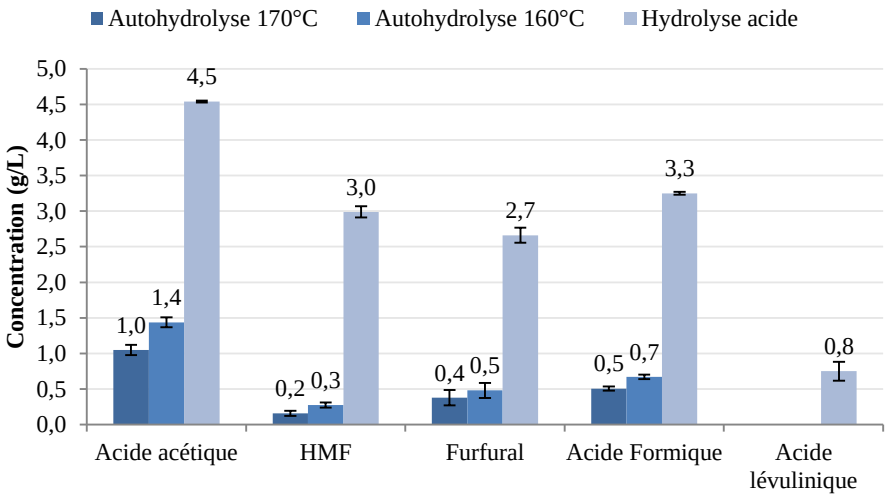


Figure 38 : Concentrations mesurées dans les hydrolysats après autohydrolyses (160°C et 170°C) et hydrolyse acide (Note : la présence d'acide lévulinique dans les hydrolysats d'autohydrolyses n'a pas été décelée)

Le Tableau 17 montre explicitement la propension qu'a l'hydrolyse acide à dégrader les saccharides comparée aux autohydrolyses. La quantité d'hexoses et pentoses qui a été dégradée pendant le traitement a été calculée à partir des concentrations en HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique (voir la méthodologie dans le chapitre V partie B.4). Les proportions de saccharides dégradés ont ensuite être déterminées. L'hydrolyse acide entraine la dégradation de 14 ± 1,4% des hexoses extraits, alors que les autohydrolyses n'en dégradent que 1,2 ± 0,2% à 1,3 ± 0,3%. Cette tendance se retrouve également au niveau des pentoses : l'hydrolyse acide dégrade environ la moitié des pentoses extraits, et les autohydrolyses un quart. Ce tableau confirme en outre que les pentoses sont plus aisément sujet à la dégradation.

	Autohydrolyse 170	Autohydrolyse 160	Hydrolyse acide
Hexoses mesurés dans hydrolysat (g/L)	23,0 ± 1,0	24,6 ± 1,1	33,9 ± 1,4
Hexoses dégradés (g éq. C6/L)	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,07	5,4 ± 1,1
Dégradation des hexoses	1,2 ± 0,2%	1,3 ± 0,3%	14 ± 2,8%
Pentoses mesurés dans hydrolysat (g/L)	7,2 ± 0,4	10,1 ± ,05	11,0 ± 0,7
Pentoses dégradés (g éq. C5/L)	2,7 ± 0,5	4,6 ± 0,9	13,8 ± 2,8
Dégradation des pentoses	27 ± 5,4%	31 ± 6,2%	56 ± 11,1%

Tableau 17 : Concentrations en hexoses et pentoses dans les hydrolysats, concentrations équivalentes théoriques en hexoses et pentoses dégradés et proportions d'hexoses en pentoses dégradés

1.2 Composition des copeaux après les traitements d'hydrolyse

La composition en saccharides des copeaux n'a été mesurée que pour l'autohydrolyse 170, car celle-ci sera utilisée pour l'étude des post traitements. Sur les autres hydrolyses, la composition des copeaux a été calculée à partir de la composition initiale du bois, du rendement d'extraction et des compostions en saccharides et produits de dégradation des hydrolysats. Il a été considéré que la composition de l'hydrolysat récupéré après filtration et celui piégé dans les copeaux était

la même. De plus les mesures de pentose et hexoses ont été corrigées de leurs produits de dégradation, comme le HMF, le furfural, l'acide formique et l'acide lévulinique. Les ratios utilisés dans le calcul de la composition des copeaux de départ et des copeaux hydrolysés sont : $\frac{Arabinose}{Xylose} = 0{,}14$, $\frac{Mannose}{Glucose} = 4{,}3$ et $\frac{Galactose}{Glucose} = 0{,}2$. Des essais avec des ratios différents ont montré que quels que soient les ratios sélectionnés, les tendances observées sont identiques. La quantité de lignine hydrolysée et extraite a été mesurée par absorbance dans les hydrolysats. La comparaison des résultats indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus par le calcul et la mesure directe (Figure 39), ce qui confirme aussi que le modèle utilisé pour compenser les saccharides dégradés est valide.

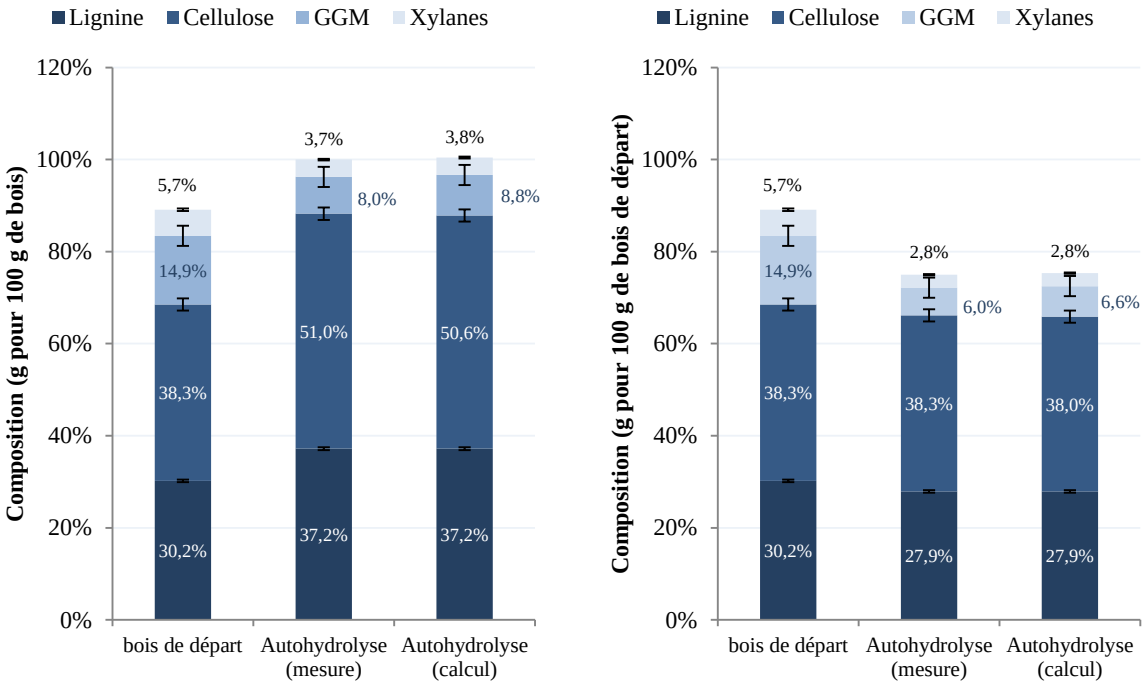


Figure 39 : Comparaison entre les compositions de bois mesurées et calculées pour l'autohydrolyse 170. Composition des copeaux (à gauche) et par rapport au bois de départ (à droite)

La quantité de matière solide extraite a été calculée sur les copeaux hydrolysés puis lavés. Les deux autohydrolyses permettent de prélever 25 ± 2% de matière solide quand l'hydrolyse acide semble en retirer un peu plus, 27 ± 2%, même si la dispersion des mesures ne permet pas d'être catégorique. Ces résultats, notamment concernant les autohydrolyses, sont relativement élevés [57] mais ont déjà été observés [51].

Du fait de l'extraction des hémicelluloses, les proportions de lignine et de cellulose sont plus importantes dans les copeaux hydrolysés (Figure 40), ce qui peut avoir des conséquences lors de la cuisson que ces copeaux subiront. L'impact du traitement sur les copeaux de bois est visible quand ces compositions sont rapportées au bois de départ (Figure 41). Les deux autohydrolyses présentent des résultats similaires avec des quantités de xylanes et de GGM extraits très proches. Elles permettent d'extraire entre 55 et 58% de GGM, et entre 50 et 60% de xylanes. L'hydrolyse acide mène à l'extraction de 86% des GGM et de la totalité des xylanes. L'impact sur la lignine des traitements est très limité, que ce soit les autohydrolyses et l'hydrolyse acide. Les hydrolysats provenant des autohydrolyse 170, autohydrolyse 160 et hydrolyse acide contenaient respectivement 1,97 ; 1,99 et 2,87 g/L de composés dérivant de la

lignine, soit l'extraction de 2,6 à 3,8% de la lignine présente dans le bois. De telles quantités extraites ont déjà été observées [53], [57]. La lignine a été également mesurée directement dans les copeaux hydrolysés, en donnant des quantités extraites quasiment nulles. Cet écart entre les deux types de mesure avait déjà été observé de manière similaire [53].

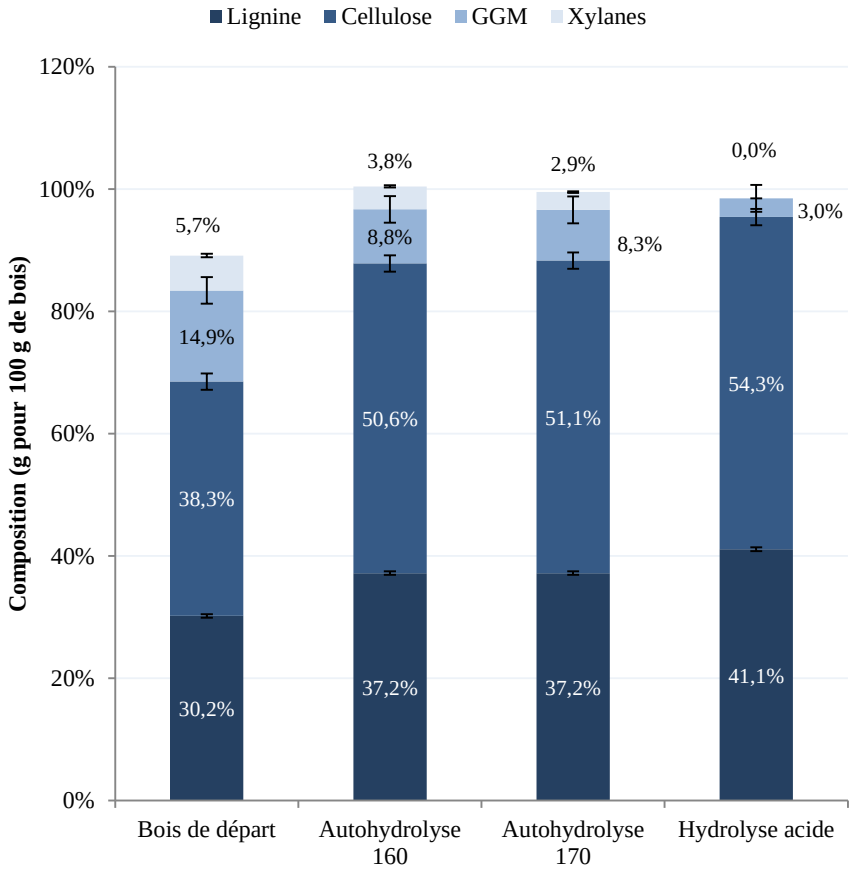


Figure 40 : Composition des copeaux avant et après extraction. La composition en cellulose, GGM et xylanes a été calculée en retranchant à la composition du bois les quantités mesurées dans les hydrolysats

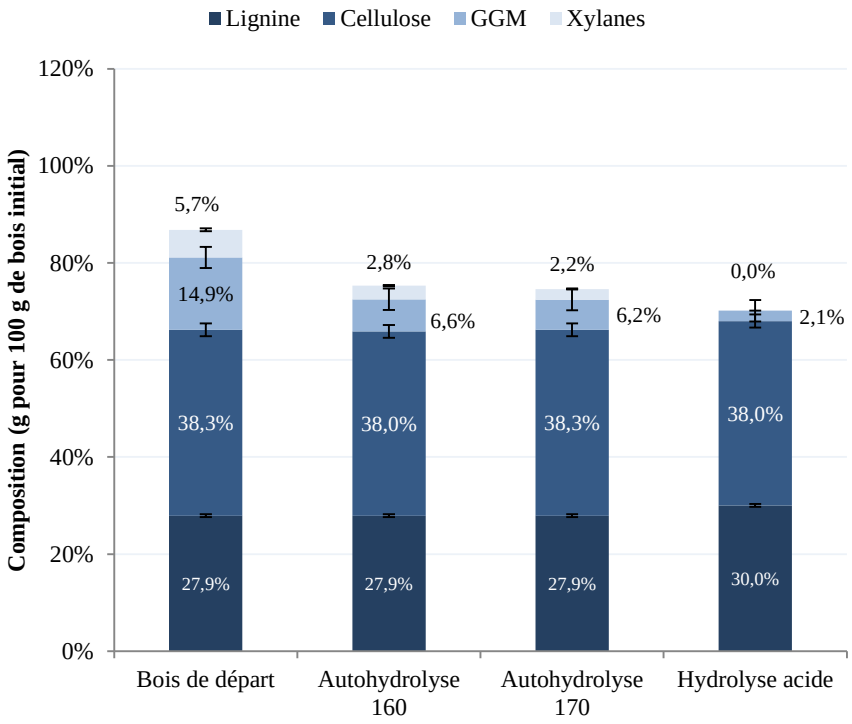


Figure 41 : Composition des copeaux avant et après extraction par rapport au bois de départ. La composition en cellulose, GGM et xylanes a été calculée en retranchant à la composition du bois les quantités mesurées dans les hydrolysats

Les groupes acétyles sont entièrement extraits lors de l'hydrolyse acide alors que les autohydrolyses ne permettent d'en extraire que 70 ± 5%, 20% étant présents sous forme d'acide acétique dans l'hydrolysat et 50% étant toujours liés aux hémicelluloses (Figure 42). Si le traitement secondaire utilisé pour finir la dépolymérisation permet d'éviter toute désacétylation supplémentaire, le pouvoir inhibiteur de l'hydrolysat en serait réduit. Néanmoins, la fermentation a toute les chances de ne plus être rentable dans ce cas. En effet, d'après ces données, entre 25 et 30% des unités de GGM présentes dans les hydrolysats d'autohydrolyses sont encore liées à des groupes acétyles. Ces saccharides ne pouvant pas être fermentés, cela signifie que, sans libération de ces groupes acétyles, la production potentielle d'éthanol serait réduite de 25 à 30%.

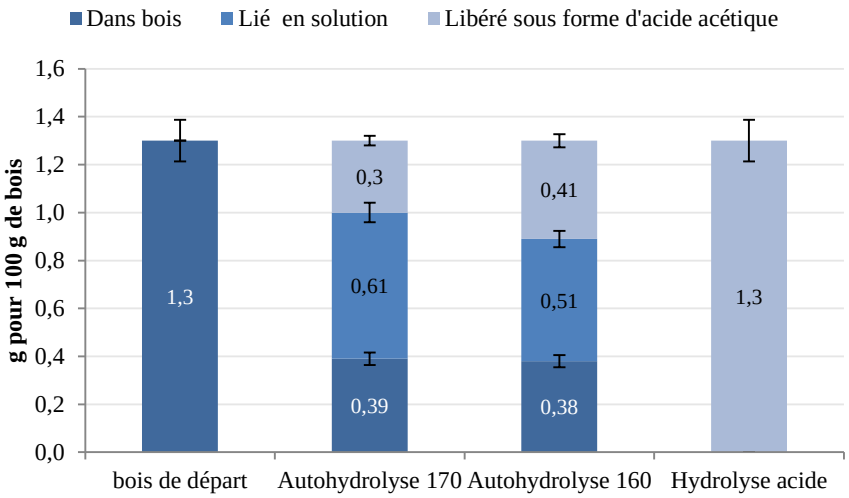


Figure 42 : Devenir des groupes acétyles après chaque traitement

1.3 Problématique de la récupération de tous les saccharides solubilisés et impact sur le potentiel de production d'éthanol

Après l'hydrolyse, l'hydrolysat est récupéré par simple égouttage des copeaux. Une partie de l'hydrolysat reste donc piégée dans les copeaux.

La siccité des copeaux après le prétraitement a été mesurée à 35%, contre 55% avant le traitement. Ainsi, avec un ratio L/B de 4, seulement 65% ± 2% de la liqueur totale contenue initialement dans les copeaux (eau ajoutée et eau déjà présente) est récupérée pour ces traitements. Le produit final est donc composé de trois parties, une partie solide : les copeaux constitué des polymères non solubilisés, et deux parties liquides contenant les composés solubilisés : l'une piégée dans les copeaux et l'autre récupérée par égouttage et disponible pour la fermentation. Il sera fait l'hypothèse que les concentrations des différents constituants sont équivalentes dans ces deux phases liquides

La composition de ces trois parties est résumée dans le Tableau 18 pour l'autohydrolyse 170, dans le Tableau 19 pour l'autohydrolyse 160 et dans le Tableau 20 pour l'hydrolyse acide. Ces tableaux permettent notamment de prévoir les productions d'éthanol envisageables selon le prétraitement si l'ensemble des hexoses extraits, monomères et oligomères, est fermenté. Dans le cas des autohydrolyses, il faudra alors procéder à une hydrolyse secondaire pour dépolymériser les oligomères solubilisés en monomères**.** S'il est considéré que la fermentation de tous les hexoses se fera avec un rendement de 90% par rapport au rendement théorique, entre 2,5 et 2,6 g d'éthanol pour 100 g de bois pourraient être produits avec les autohydrolyses. Ce chiffre est 3,6 g pour 100 g de bois avec l'hydrolyse acide.

En considérant l'ensemble des saccharides solubilisés et en faisant l'hypothèse qu'un procédé permettant de récupérer les saccharides solubles piégés dans les copeaux est mis au point, par un lavage efficace par exemple, les chiffres de production d'éthanol atteindraient alors 3,8 à 4,1 g d'éthanol pour 100 grammes de bois pour les autohydrolyses et 5,6 pour l'hydrolyse acide.

	Dans copeaux		Hydrolysat récupéré par égouttage
	Phase solide	Phase liquide	
Arabinane	0,64 ± 0,54	0,25 ± 0,03	0,47 ± 0,06
Galactane	0,44 ± 0,69	0,54 ± 0,04	0,99 ± 0,08
Glucane	39,88 ± 0,89	0,51 ± 0,04	0,94 ± 0,05
Xylane	2,73 ± 0,11	0,63 ± 0,06	1,17 ± 0,12
Mannane	4,57± 0,16	1,85 ± 0,11	3,44 ± 0,21
Groupes acétyles	0,30 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Lignine	27,3 ± 0,2	0,28 ± 0,3	0,51 ± 0,06
HMF	-	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Furfural	-	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Acide acétique	-	0,15 ± 0,01	0,26 ± 0,02
Acide formique	-	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Acide lévulinique	-	0	0
Ethanol potentiel (g/100 g de bois)	-	1,3	2,5

Tableau 18 : Composition des différentes phases résultant de l'autohydrolyse 170 (g pour 100 g de bois de départ). La phase solide est obtenue par différence entre les analyses de l'hydrolysat et de la composition initiale du bois.

	Dans copeaux		Hydrolysat récupéré par égouttage
	Phase solide	Phase liquide	
Arabinane	1,25 ± 1,05	0,46 ± 0,06	0,86 ± 0,11
Galactane	0,59 ± 0,92	0,59 ± 0,05	1,09 ± 0,09
Glucane	39,88 ± 0,89	0,54 ± 0,03	0,99 ± 0,05
Xylane	3,15 ± 0,12	0,78 ± 0,08	1,44 ± 0,14
Mannane	4,94 ± 0,12	1,98 ± 0,12	3,67 ± 0,23
Groupes acétyles	0,30 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Lignine	27,3 ± 0,2	0,28 ± 0,3	0,51 ± 0,06
HMF	-	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Furfural	-	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Acide acétique	-	0,20 ± 0,01	0,37 ± 0,02
Acide formique	-	0,07 ± 0,00	0,13 ± 0,00
Acide lévulinique	-	0	0
Ethanol potentiel (g/100 g de bois)	-	1,4	2,6

Tableau 19 : Composition des différentes phases résultant de l'autohydrolyse 160 (g pour 100 g de bois de départ). La phase solide est obtenue par différence entre les analyses de l'hydrolysat et de la composition initiale du bois.

	Dans copeaux		Hydrolysat récupéré par égouttage
	Phase solide	Phase liquide	
Arabinane	0,94 ± 0,79	0,33 ± 0,04	0,61 ± 0,08
Galactane	0,26 ± 0,41	0,64 ± 0,05	1,18 ± 0,10
Glucane	34,64 ± 0,78	1,07 ± 0,06	1,99 ± 0,11
Xylane	1,80 ± 0,07	1,03 ± 0,1	1,91 ± 0,19
Mannane	2,59 ± 0,08	2,56 ± 0,16	4,75 ± 0,29
Groupes acétyles	0	0	0
Lignine	27,3 ± 0,2	0,28 ± 0,3	0,52 ± 0,06
HMF	-	0,42 ± 0,10	0,78 ± 0,18
Furfural	-	0,37 ± 0,10	0,16 ± 0,19
Acide acétique	-	0,64 ± 0,03	1,18 ± 0,05
Acide formique	-	0,46 ± 0,03	0,85 ± 0,06
Acide lévulinique	-	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,02
Ethanol potentiel (g/100 g de bois)	-	2,0	3,6

Tableau 20 : Composition des différentes phases résultant de l'hydrolyse acide (g pour 100 g de bois de départ). La phase solide est obtenue par différence entre les deux phases liquides et la composition initiale du bois.

1.4 Bilan sur les préhydrolyses effectuées en milieu acide

L'hydrolyse acide permet d'extraire 27 ± 2% des composants du bois. Sur ces 27%, 24,9% sont connus et référencés dans le Tableau 20 sous forme de lignine, groupes acétyles et saccharides. Pour ces derniers, les produits de dégradations ont été comptabilisés. Les pourcentages restants sont composés d'extractibles, de groupes uroniques ainsi que des produits de dégradation de sucres non référencés. L'autohydrolyse permet d'extraire 25% ± 2%. Les données les plus fiables concernent l'autohydrolyse 170, pour laquelle la composition des copeaux extraits a été évaluée. La teneur extraite mesurée s'élève seulement à 13,5%, dont 10,8% de saccharides. Quand la composition initiale de bois est comparée avec la somme des compositions des hydrolysats et des copeaux de bois obtenus, les mesures bouclent à 93% pour les pentoses et 99% pour les hexoses. Pour ce calcul, les hexoses et pentoses provenant des produits de dégradations ont été comptabilisés (cf. chapitre V partie B.4 pour la méthodologie). La différence mesurée entre la perte de matière sèche observée et les teneurs connues est vraisemblablement due aux produits de dégradation qui ne sont pas mesurés ou qui ont polymérisé et aux autres espèces non comptabilisées (acide methylglucuronique, extractibles,…)

Pour résumer cette partie, chaque type de traitement a ses avantages et ses inconvénients. L'autohydrolyse ne permet pas d'extraire autant de saccharides que l'hydrolyse acide, et leur concentration est plus faible. De plus, elle nécessite un traitement secondaire pour dépolymériser les oligomères extraits en vue de les fermenter. Ce traitement aura un impact sur la rentabilité du procédé, mais aura l'avantage de ne pas affecter la cellulose. Ce point est le principal inconvénient de l'hydrolyse acide. Les teneurs en glucose montrent que la cellulose est dégradée, ce qui a été confirmé par des mesures de DPv [57]. Par ailleurs, les quantités en inhibiteurs sont beaucoup plus importantes, notamment en ce qui concerne les furanes, dont la formation est limitée après une autohydrolyse. Finalement il a été montré qu'une partie

importante des matières solubilisées pendant les préhydrolyses reste piégée à l'intérieur des copeaux, si un simple égouttage est appliqué pour récupérer l'hydrolysat.

2 Extractions en milieu alcalin

Il est bien connu que les extractions alcalines ne sont pas aussi efficaces que les extractions acides en termes de quantités de saccharides extraites, qui sont de plus exclusivement sous forme d'oligomères. L'avantage de ces extractions est qu'elles s'intègrent parfaitement dans une usine kraft, étant un prétraitement adéquat avant ce type de cuisson. De plus, elles utilisent des réactifs qui sont d'ores et déjà présents dans ces usines. Trois types d'extractions alcalines ont été testés. Le premier, qui peut être apparenté à des *Cold Caustic Extractions,* se fait à basses températures, de l'ordre de 30°C. Le deuxième se fait à une température de 90°C, selon les paramètres optimaux définis à partir de [68]. Enfin, le troisième, l'extraction en milieu quasi-neutre, (NNE) s'effectue à un pH légèrement supérieur à 7, et se termine habituellement en milieu acide, du fait de l'acidification de l'hydrolysat dû à la désacétylation des hémicelluloses.

2.1 Cold Caustic Extraction

Ce procédé est habituellement utilisé sur les pâtes blanchies destinées à une utilisation chimique afin d'en extraire les hémicelluloses résiduelles. Il s'agit généralement d'un traitement à fort alcali, à température quasi ambiante pendant quelques minutes. Trois CCE différentes ont été effectuées à 30°C pour un ratio L/B de 4 (voir paramètres Tableau 21). La première est une CCE typique. Pour la seconde, la durée a été allongée à 4h pour évaluer le potentiel d'un alcali aussi fort à cette température. La troisième se fait avec l'alcali utilisé lors de l'extraction alcaline (cf. partie B.2.2 ci-dessous), et peut permettre de mesurer l'influence de la température.

	Durée	NaOH (%/bois)
CCE 1	30 min	75%
CCE 2	240 min	75%
CCE 3	30 min	33,30%

Tableau 21 : Paramètres des extractions alcalines

Les concentrations en saccharides mesurées dans les liqueurs d'extractions après ces procédés sont rassemblées sur la Figure 43. Elles sont extrêmement faibles, démontrant clairement que ce type de procédé n'est pas efficace sur des copeaux de bois. Même la CCE la plus efficace, la CCE 2, ne permet d'extraire que 11 ± 1,0% de xylose, le saccharide extrait en plus grande quantité. De plus, la totalité des saccharides sont sous forme d'oligomères. Ces traitements permettent en outre de libérer les groupes acétyles en quantité importante et affectent significativement la teneur en lignine mesurée (Tableau 22).

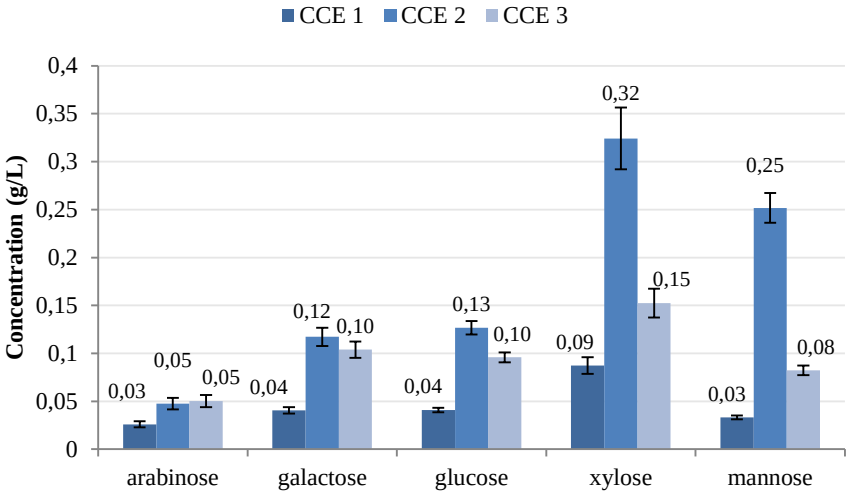


Figure 43 : Concentrations en saccharides (exclusivement sous forme d'oligomères) mesurées dans les liqueurs d'extraction après les CCE

	Concentration acide acétique (g/L)	% groupes acétyles libérés	% lignine klason extraite
CCE 1	2,15 ± 0,03	48 ± 3	4,5 ± 0,2
CCE 2	4,28 ± 0,02	95 ± 6	5,6 ± 0,3
CCE 3	2,39 ± 0,03	53 ± 4	0

Tableau 22 : Groupes acétyles libérés et lignine extraite suite aux CCE

2.2 Extraction alcaline

L'extraction alcaline se déroule à une température modérée avec un alcali relativement élevé. Les paramètres appliqués à cette extraction ont notamment été sélectionnés suite à une étude effectuée sur du bois de mélèze [68]. Un ratio L/B de 4 a été choisi, à une température de 90°C et une quantité de soude de 33,3% par rapport au bois (soit 2,08 mol/L). L'extraction consiste en une phase de montée en température de 10 min suivie de 230 min à la température de réaction, soit un traitement total de 4 heures.

La quantité de saccharides extraite est plus que modérée. Des concentrations de 1,22 ± 0,08 g/L d'hexoses et 0,93 ± 0,07 g/L de pentoses ont été mesurées dans l'hydrolysat, exclusivement sous forme d'oligomères (Figure 44). Aucune trace de produit de dégradation, HMF, furfural et acide lévulinique, n'a été logiquement détectée. En revanche, les concentrations en acides acétique et formique sont très importantes. La quasi-totalité des groupes acétyles a été hydrolysée (97,7 ± 7,0% d'extraction). L'acide formique vient quant à lui du peeling subi par les hémicelluloses, dont il constitue l'un des produits résiduels (cf. chapitre I, partie B.2.1). Ce peeling commence à des températures proches de 80°C, ce qui explique qu'il n'a pas été observé lors des CCE. Il est fortement probable que l'hydrolysat contienne également d'autres acides organiques résultants du peeling, qui n'ont pas été mesurés et qui pourraient inhiber la fermentation.

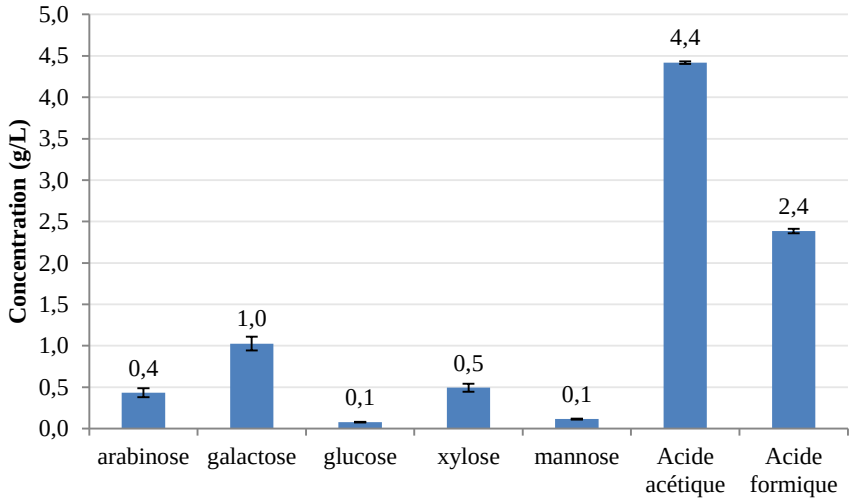


Figure 44 : Concentrations en saccharides et acides organiques mesurées dans l'hydrolysat après une extraction alcaline (saccharides exclusivement sous forme oligomère)

Le rendement d'extraction, calculé sur l'ensemble des copeaux, est de 12%, dont 0,8% composé de saccharides, 1,3 % de groupes acétyles, 1,0% d'acide formique et 2,0% de lignine. Le reste, non mesuré, doit être essentiellement constitué des produits résiduels du peeling et d'acides uroniques.
L'extraction alcaline ne permet pas d'extraire une quantité significative de saccharides, et produit une quantité non négligeable de composés inhibiteurs sous forme d'acides organiques et de produits dérivés de la lignine. De plus, la quantité de soude utilisée oblige à développer un procédé de séparation saccharides/soude efficace car son recyclage est primordial [39]. Dans ces conditions, il parait difficile d'envisager d'utiliser un tel procédé pour la production d'éthanol.

2.3 Extraction en milieu quasi-neutre

Une extraction en milieu quasi-neutre (NNE) s'effectue à température relativement élevée commençant en milieu légèrement alcalin. C'est pourquoi elle est classée dans la partie « extractions alcalines ». Cependant, du fait de la désacétylation des hémicelluloses, son pH final est légèrement acide. La liqueur utilisée peut être composée de liqueur verte diluée, produit communément utilisé dans une usine kraft.

Pour réaliser les NNE, une liqueur verte synthétique a été fabriquée. La température du traitement est de 160°C, atteinte après 10 min et conservée pendant 110 min, pour terminer avec 15 min de refroidissement (facteur H de 760 h^{-1}). Le ratio L/B est de 4. L'alcali total utilisé est de 3% (équivalent NaOH). Deux NNE ont été menées, l'une contenant de l'anthraquinone (0,05% / bois) et l'autre pas. L'anthraquinone est un produit utilisé notamment pour améliorer les rendements de cuisson kraft en limitant le peeling sévissant en milieu alcalin. C'est dans ce but que de l'anthraquinone (AQ) est ajoutée à certaines NNE. Les paramètres utilisés sont inspirés de Walton et al. [127].

Les pH finaux des NNE avec et sans AQ sont respectivement de 5,2 et 5,3. Les concentrations de saccharides, acide acétique et acide formique, mesurées dans les hydrolysats, sont similaires pour les deux NNE (Figure 45). Ces concentrations en saccharides sont bien plus élevées que pour les autres traitements alcalins vus jusqu'ici, certainement dus au pH final acide indiquant

un début d'autohydrolyse. Cependant, ces concentrations sont fortement éloignées de celles obtenues lors d'autohydrolyses et d'hydrolyses acides. De plus, la totalité des saccharides en solution sont sous forme d'oligomères. D'autre part, aucune trace d'HMF ou de furfural n'a été détectée. Une quantité non négligeable d'acide formique est mesurée, signe d'une dégradation des hémicelluloses par peeling. L'AQ ajoutée, qui devrait limiter le peeling, n'a pas d'effet au regard des concentrations en acide formique. En outre, les concentrations en acide acétique indiquent que la grande majorité des groupes acétyles a été libérée (91 ± 6% sans AQ et 93 ± 6% avec AQ).
Les concentrations en saccharides et en acide formique ainsi que le taux d'extraction confirment des résultats d'extractions similaires effectuées sur du feuillu [77].

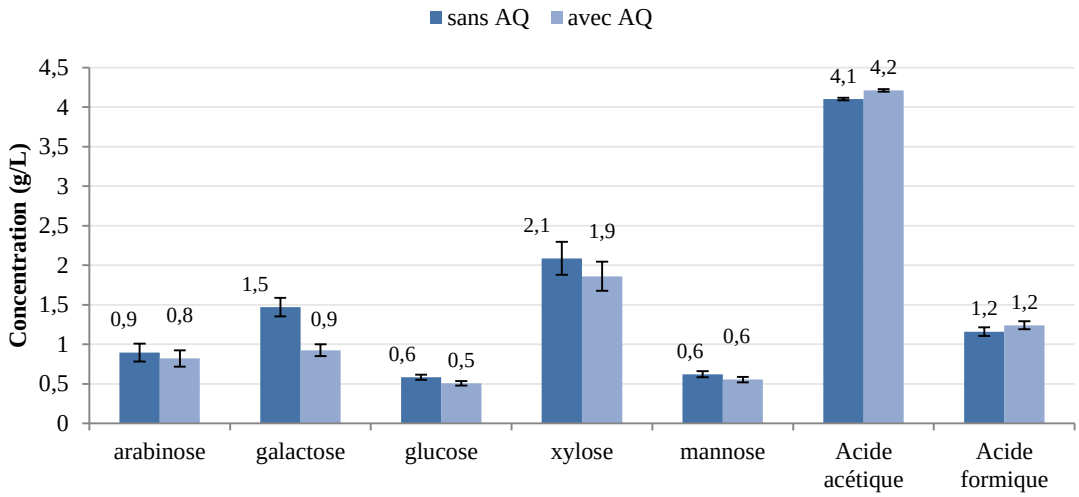


Figure 45 : Concentrations en saccharides (exclusivement sous forme d'oligomères), acide acétique et formique mesurées dans les hydrolysats après des NNE avec ou sans AQ

Le procédé de NNE est intéressant car il s'intègre parfaitement dans une usine kraft, et son impact sur la cuisson est plutôt positif [77], [78] Cependant, la quantité de saccharides extraite est relativement faible, et un traitement secondaire est indispensable pour hydrolyser les oligosaccharides en monomères. De plus, le peeling engendre la présence, en concentration importante, d'acides organiques, pouvant avoir un impact négatif sur la fermentation.

3 Bilan sur les prétraitements

Parmi les prétraitements envisagés, certains n'ont pas été convaincants (Tableau 23). L'extraction alcaline et les CCE ne permettent pas d'extraire suffisamment de saccharides. La production d'éthanol en découlant ne serait pas suffisante. Les traitements se déroulant en partie ou totalement en milieu acide sont les plus prometteurs de ce point de vue.

	Concentrations (g/L)					
	Hexoses (% monomères)	Acide acétique	HMF	Furfural	Acide formique	Acide lévulinique
Autohydrolyse 160	23,0 ± 1,0 (10%)	1,05 ± 0,07	0,16 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,51 ± 0,03	n.d.
Autohydrolyse 170	24,6 ± 1,1 (15%)	1,44 ± 0,07	0,28± 0,04	0,48 ± 0,11	0,67 ± 0,03	n.d.
Hydrolyse acide	33,9 ± 1,4 (89%)	4,54 ± 0,01	2,99 ± 0,08	2,66 ± 0,11	3,25 ± 0,02	0,75 ± 0,13
CCE 1	0,11 ± 0,01 (0%)	2,15 ± 0,03	n.d.	n.d.	0,03 ± 0,01	n.d.
CCE 2	0,50 ± 0,01 (0%)	4,28 ± 0,02	n.d.	n.d.	0,04 ± 0,01	n.d.
CCE 3	0,28 ± 0,01 (0%)	2,39 V 0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Extraction alcaline	1,22 ± 0,08 (0%)	4,42 ± 0,02	n.d.	n.d.	2,39 ± 0,03	n.d.
NNE sans AQ	2,68 ± 0,13 (0%)	4,1 0± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1,16 ± 0,05	n.d.
NNE avec AQ	1,99 ± 0,09 (0%)	4,21 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1,24 ± 0,05	n.d.

Tableau 23 : Concentrations en hexoses, acide acétique, HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique mesurées dans les hydrolysats après l'ensemble des prétraitements effectués (n.d. : non détecté)

Les teneurs en hexoses et inhibiteurs sont cruciales pour comparer les hydrolysats entre eux. Pour ce faire, les quantités d'inhibiteurs ont toutes été ramenées à des valeurs qui seraient obtenues pour des solutions contenant 100 g/L d'hexoses (Tableau 24).
La NNE a l'avantage de préserver la cellulose et de maintenir la production de pâte à papier identique. Cependant, la quantité de saccharides extraite, et donc la production potentielle d'éthanol, est très faible, ce qui rend la rentabilité du procédé aléatoire [172]. Enfin, la présence d'acides acétique et formique en grande quantité pourrait proscrire une fermentation directe sans détoxification.
L'hydrolyse acide peut se passer de traitement secondaire pour achever la dépolymérisation des hémicelluloses extraites. Cependant, la présence d'inhibiteurs en grande quantité, ainsi que son impact important sur la cellulose ont amené à privilégier l'autohydrolyse dans cette étude.
L'autohydrolyse permet en effet de limiter la création d'inhibiteurs. Cependant, la quantité de saccharides extraite est inférieure à celle obtenue après hydrolyse acide, et un traitement secondaire de dépolymérisation des oligomères est indispensable. Ce dernier doit être soigneusement ajusté afin de limiter la dégradation des saccharides et de maximiser la quantité de monomères.

	Hexoses		HMF*	Furfural*	Acide formique*	Acide acétique*
	g/L	Taux monomères				
Autohydrolyse	23,0 ± 1,0	10%	0,9 ± 0,2	1,8 ± 0,5	0,5 ± 0,1	13,5 ± 2,8
Hydrolyse acide	33,9 ± 1,4	89%	8,8 ± 2,4	7,9 ± 2,5	9,6 ± 0,1	13,4 ± 1,5
NNE	2,0 à 2,7 ± 0,1	0%	0,4 à 1,0 ± 0,1	0,7 à 1,0 ± 0,3	43,4 à 62,4 ± 6,6	153 à 211 ± 23

Tableau 24 : Caractéristiques des hydrolysats après autohydrolyse, hydrolyse acide et NNE ; *Concentrations normalisées à 100 g/L d'hexoses

C. Traitement d'hydrolyse secondaire

L'optimisation de l'étape de dépolymérisation des oligomères est primordiale avant la fermentation. L'objectif est de dépolymériser l'ensemble des oligomères en limitant au maximum la dégradation des saccharides obtenus. Pour cela, des hydrolyses en milieu acide ont été tout d'abord privilégiées, dans la continuité de l'autohydrolyse. Des essais d'hydrolyse enzymatiques ont également été menés.

1 Hydrolyses secondaires en milieu acide

Lors d'une hydrolyse secondaire, deux réactions peuvent se dérouler : la dépolymérisation des oligomères en monomères, et la dégradation des monosaccharides obtenus en HMF ou furfural par exemple. L'objectif est donc de déterminer les paramètres permettant de favoriser la première au détriment de la seconde. Il serait également intéressant de limiter la baisse de pH pour limiter la consommation de produits chimiques, car il faudra ensuite réajuster le pH pour la fermentation.

1.1 Essais préliminaires

La procédure habituelle utilisée pour dépolymériser un milieu composé d'oligosaccharides consiste à ajouter 2 mL d'acide sulfurique (24% w/w soit 281 g/L) à 10 mL de solution, pour atteindre une concentration en acide de 46,8 g/L. Ce mélange est ensuite placé dans un autoclave 60 min à 120°C (d'après [173]). Cette procédure est utilisée à des fins analytiques pour déterminer le taux d'oligomères dans une solution de sucres. Les résultats de cette procédure seront utilisés comme référence par la suite. Cette opération n'engendre pas la formation d'une quantité significative d'inhibiteurs, ce qui a été confirmé en appliquant ce traitement sur une solution synthétique de saccharides. Cependant, si ce traitement était utilisé industriellement, la consommation d'acide sulfurique s'élèverait à plus de 12 g pour 100 g de bois (en faisant l'hypothèse que 65% de la liqueur est récupérée et traitée après l'autohydrolyse). Par comparaison, l'hydrolyse acide étudiée dans les parties précédentes ne nécessite qu'1 g d'acide sulfurique pour 100 g de bois. Une étude sur les paramètres a été réalisée pour obtenir, voire améliorer les résultats de référence tout en diminuant la consommation d'acide.

Les premiers essais ont consisté à poursuivre les autohydrolyses sur les hydrolysats après avoir retiré les copeaux de bois, sans ajouter d'acide. Trois températures d'hydrolyses ont été sélectionnées pour ces essais préliminaires (Tableau 25). Les sévérités des traitements sont également indiquées avec le facteur H, le facteur P et la sévérité combinée CS.

Température	Durée montée en température	Durée à température	Facteur H	Facteur P	CS
120°C	0 min	1 à 6 h	9 à 53	8 à 47	-1,3 à -0,6
160°C	23 min	60 à 210 min	440 à 1440	305 à 990	-0,1 à 0,4
190°C	0 min	5 à 40 min	370 à 2940	220 à 1735	-0,4 à 0,6

Tableau 25 : Paramètres d'hydrolyses secondaires réalisées sans ajout d'acide

L'ensemble des essais a été réalisé sur un hydrolysat d'autohydrolyse dont les teneurs sont rappelées dans le Tableau 26. Les concentrations de référence obtenues après l'hydrolyse secondaire y sont également indiquées. Les concentrations en saccharides constituent *a priori* les maximums atteignables.

	Hydrolysats d'autohydrolyses (g/L)	Hydrolyse secondaire de référence (g/L)
Arabinose	2,82 ± 0,27	3,76 ± 0,36
Galactose	1,60 ± 0,24	4,64 ± 0,69
Glucose	0,33 ± 0,06	4,25 ± 0,72
Xylose	3,08 ± 0,22	6,34 ± 0,45
Mannose	1,17 ± 0,14	15,70 ± 1,89
Acide acétique	1,43 ± 0,10	3,18 ± 0,30
HMF	0,28 ± 0,06	0,39 ± 0,09
Furfural	0,48 ± 0,13	0,91 ± 0,25
Acide formique	0,51 ± 0,04	0,71 ± 0,05
Acide lévulinique	n.d	0,20 ± 0,02

Tableau 26 : Concentrations en saccharides de l'hydrolysat avant et après l'hydrolyse secondaire de référence (n.d.: non détecté)

Dans un deuxième temps, des essais d'hydrolyses secondaires en présence d'un acide fort ont été effectués à 160 et 120°C. Les paramètres sont résumés dans le Tableau 27.

Température	Durée montée en température	Durée à température	Concentration H_2SO_4	Facteur H	Facteur P	CS
160°C	0 min	1 à 4 h	0,5% (w/w)	396 à 1585	270 à 1090	1,1 à 1,7
120°C	0 min	60 min	0 à 6% (w/w)	9	8	-1,3 à 1,5

Tableau 27: Paramètres d'hydrolyses secondaires réalisées avec ajout d'acide

1.1.1 Autohydrolyses secondaires à 120°C

Les concentrations en monosaccharides, acide acétique, HMF et furfural mesurées pendant l'autohydrolyse secondaire sont données sur la Figure 46. Pendant les 6 heures de traitement, les variations sont insignifiantes pour la dépolymérisation des saccharides comme pour l'hydrolyse des groupes acétyles. A cette température, l'ajout d'un acide comme catalyseur est donc indispensable pour obtenir une dépolymérisation.

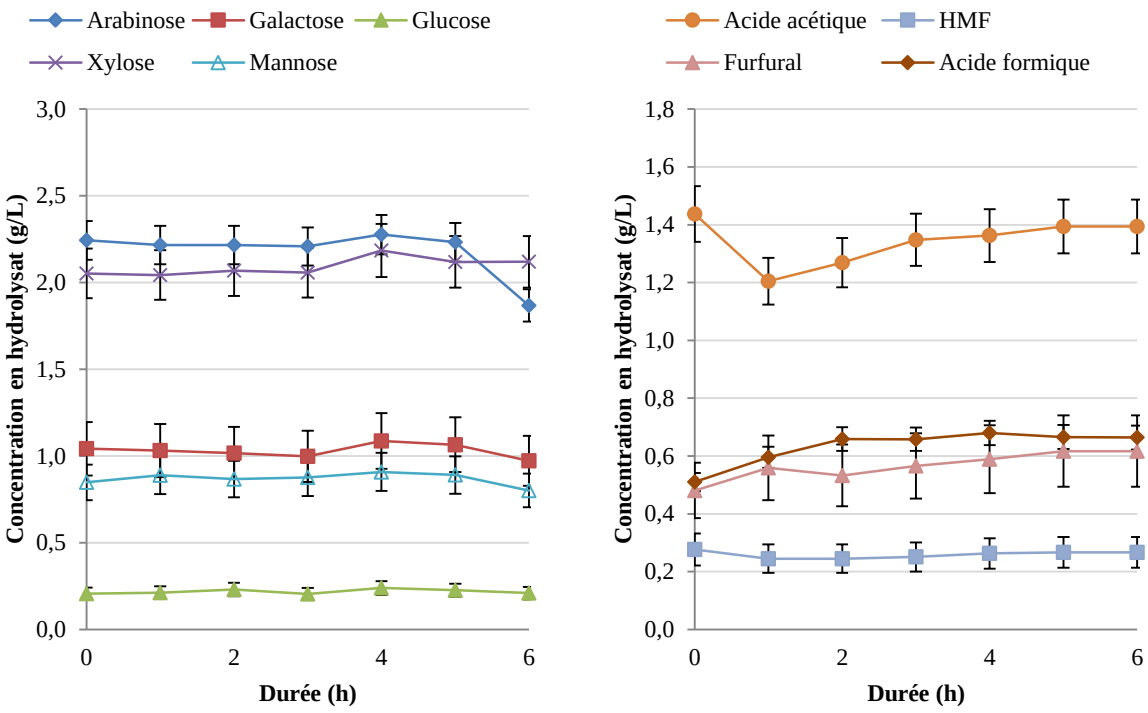


Figure 46 : Concentrations en saccharides (gauche), acide acétique, HMF et furfural (droite) mesurées après hydrolyses secondaires à 120°C sans ajout d'acide

1.1.2 Autohydrolyses secondaires à 190°C

Cette étude porte sur l'utilisation d'une température élevée, mais avec des temps relativement courts, pour limiter la sévérité du traitement. Les résultats montrent néanmoins que, pour des temps allant de 5 à 40 min, les concentrations en monosaccharides sont loin des maximums visés (Figure 47). Il y a deux raisons à cela. Tout d'abord, la dépolymérisation n'est pas achevée après 40 min. En effet, la concentration en acide acétique montre que l'ensemble des groupes acétyles n'a pas été libéré. De plus, si les produits de dégradation sont pris en compte avec les concentrations en monosaccharides, les résultats restent loin des quantités obtenues en référence.

Par ailleurs, les réactions de dégradations sont importantes à ces températures. Concernant les pentoses, elles prennent même le pas sur la dépolymérisation. La diminution de leurs concentrations démontrent que les sucres sont dégradés plus rapidement qu'ils ne sont libérés sous forme de monomères.

Concernant les hexoses, une hausse des concentrations est observée. Cependant, l'augmentation de la concentration en HMF atteste d'une dégradation importante. Il est à noter que la présence d'acide lévulinique n'a pas été détectée lors de ces essais.

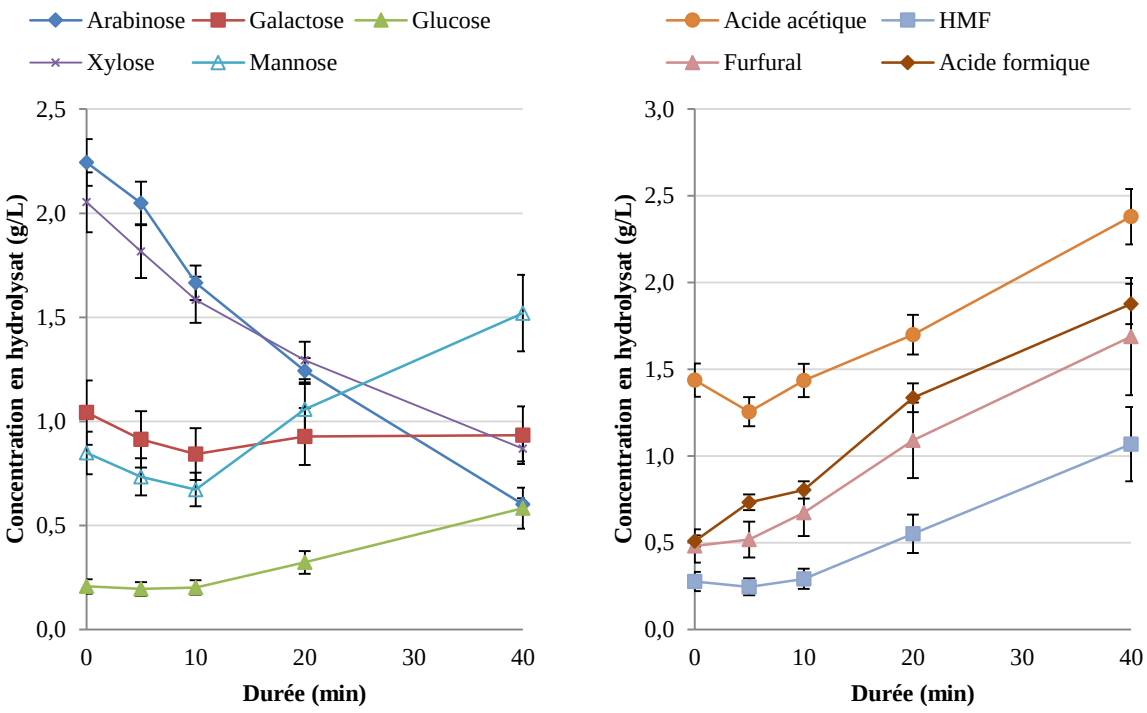


Figure 47: Concentrations en saccharides (gauche), acide acétique, acide formique, HMF et furfural (droite) mesurées après hydrolyses secondaires à 190°C sans ajout d'acide

1.1.3 Autohydrolyses secondaires à 160°C

Cette température est similaire à celle utilisée lors de l'autohydrolyse. Les concentrations ont été mesurées après 60, 150 et 210 min de réaction à 160°C. Dans tous les cas la durée de montée en température était de 23 min. Une augmentation des concentrations en hexoses est observée pendant cette hydrolyse (Figure 48). Cependant, les concentrations obtenues sont loin de rivaliser avec les maximums théoriques (6,61 ± 0,4 g/L après 210 min, pour 24,6 ± 1,4 selon la référence). La concentration en HMF après 60 min est supérieure à celle obtenue en suivant la norme. La réaction de dégradation est donc favorisée à cette température et sa cinétique est légèrement inférieure à la cinétique de la réaction de dépolymérisation des hexoses. Concernant les pentoses, la cinétique de dégradation a pris le pas sur celle de la dépolymérisation. C'est pourquoi la concentration en pentoses diminue alors que celle en furfural augmente en parallèle. De manière similaire aux observations effectuées à 190°C, les concentrations en acide acétique mesurées, qui montrent que tous les groupes acétyles n'ont pas été libérés, suggèrent que la dépolymérisation des oligomères n'est pas totale après 210 min.
La diminution du pH à l'aide d'un acide fort semble donc indispensable.

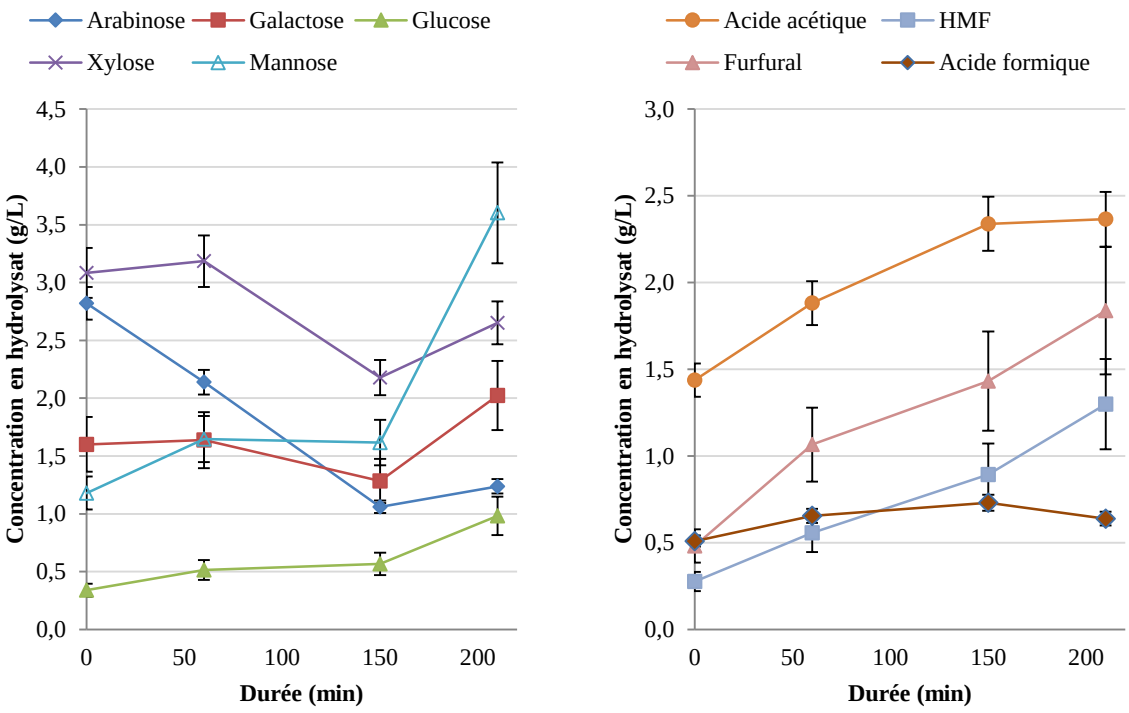


Figure 48 : Concentrations en saccharides (gauche), acide acétique, HMF et furfural (droite) mesurées après hydrolyses secondaires à 160°C sans ajout d'acide

1.1.4 Hydrolyses 160°C catalysées par acide sulfurique à 0,5% (w/w)

Des essais à 160°C ont été effectués avec l'ajout d'une faible quantité d'acide sulfurique pour obtenir une concentration finale de 0,5% (5 g/L). Le traitement a été mené jusqu'à 4 heures (Figure 49), toutefois dès la première heure de traitement, la dégradation des saccharides est importante. L'ajout d'acide catalyse effectivement la dépolymérisation. Cependant, la dégradation de ces sucres ne permet pas d'obtenir des concentrations importantes en monomères, alors que celles en HMF, furfural et acide formique augmentent fortement. L'apparition d'acide lévulinique provenant du HMF est également observée pour la première fois. Elle serait donc favorisée par des pH bas. La majorité des études traitant de la production d'acide lévulinique à partir de saccharides utilisent un catalyseur acide. Aucune étude n'a été trouvée étudiant la synthèse ou non de cet acide durant une autohydrolyse. Il en ressort néanmoins que plus l'acide utilisé est fort, ou le pH d'extraction bas, plus la cinétique de production d'acide lévulinique à partir du furfural est élevée [174]–[178]. Par ailleurs, l'utilisation d'un acide faible comme l'acide phosphorique fait chuter drastiquement la cinétique de production d'acide lévulinique [179]. Toutes ces observations vont dans le sens de ce qui est remarqué lors des hydrolyses secondaires menées ici.

Ces expériences montrent que l'ajout d'acide est bien indispensable pour effectuer une hydrolyse secondaire efficace. Cependant, la dégradation est très importante après 60 min. L'utilisation de telles conditions, si elles sont possibles, ne pourront se faire que pour des durées plus courtes.

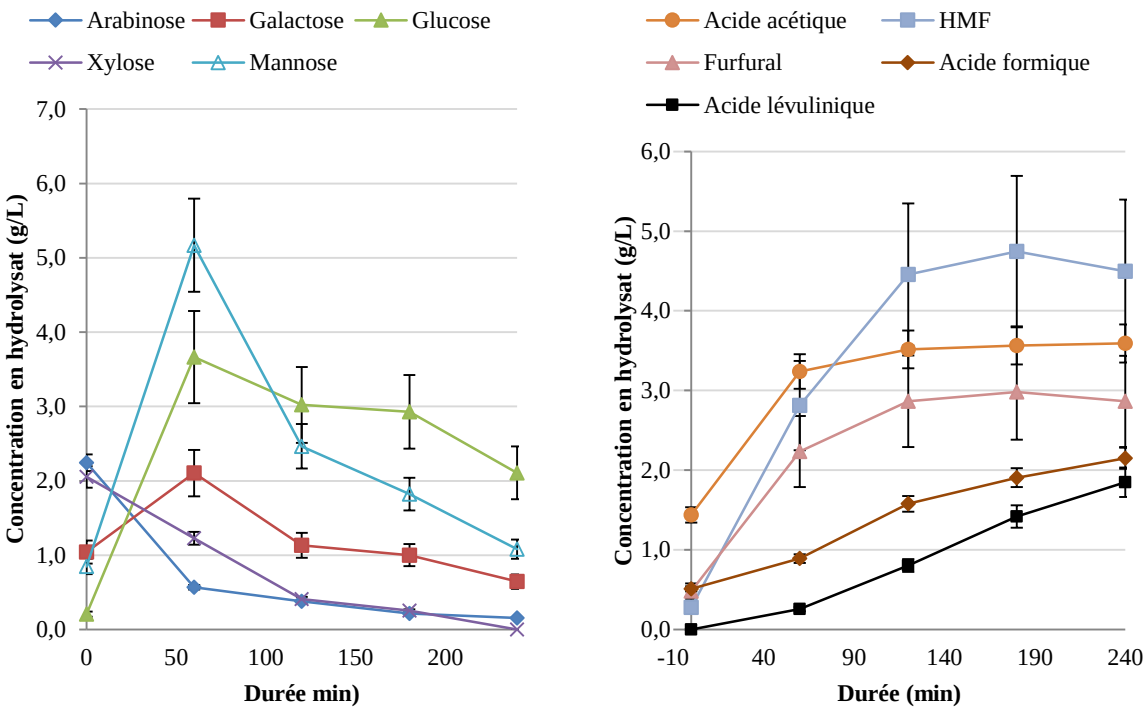


Figure 49 : Concentrations en saccharides (gauche), acide acétique, acide formique, acide lévulinique, HMF et furfural (droite) mesurées après hydrolyses secondaires à 160°C avec 0,5% d'acide sulfurique

1.1.5 Hydrolyses 120°C catalysées par acide sulfurique

L'utilisation d'acide à 160°C ne s'est pas révélée satisfaisante. Des essais ont été menés en se rapprochant des conditions de référence. Dans l'objectif de limiter l'utilisation d'acide et la diminution du pH, l'effet de la concentration en acide sulfurique a été évalué sur un hydrolysat d'autohydrolyse à 120°C pendant 60 min. Des concentrations allant de 0 à 6% (w/w), 4% étant la référence, ont été testées. Au regard des concentrations mesurées en hydrolysat, il s'avère qu'utiliser plus de 1% d'acide sulfurique n'apporte pas de gain évident : la totalité des groupes acétyles est libérée et les concentrations en saccharides ne progressent plus significativement (Figure 50). De plus, dans ces conditions la dégradation des saccharides est infime. Les concentrations en HMF, furfural et acide formique évoluent peu. Néanmoins, la présence d'acide lévulinique en faible quantité est détectée. Sa concentration est modeste mais augmente avec la concentration en acide sulfurique. Cette observation corrobore les précédentes montrant que des pH bas sont nécessaires à l'apparition de cet acide à partir de HMF. Cela signifie que prolonger ce traitement de plus de 60 min ne peut être que bénéfique pour compenser un manque d'acide, tant que la dépolymérisation n'est pas totale.

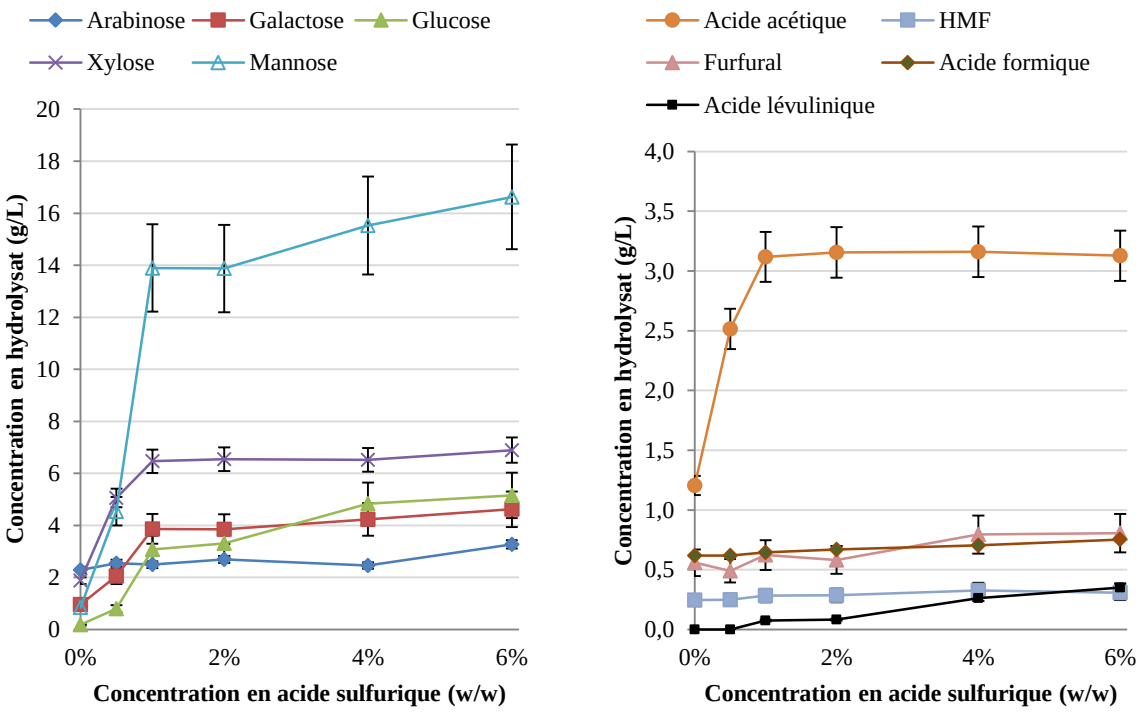


Figure 50: Concentrations en saccharides (gauche), acide acétique, acide formique, HMF et furfural (droite) mesurées après hydrolyses secondaires en fonction de la concentration en acide sulfurique, pour un traitement à 120°C pendant 60 min

1.1.6 Bilan sur les essais préliminaires

Ces essais préliminaires ont permis de tirer quelques enseignements qui serviront à optimiser l'hydrolyse secondaire.
Tout d'abord, il semblerait que les réactions de dégradations soient favorisées par des hautes températures. L'énergie d'activation de ces réactions doit être plus importante que celle des réactions de dépolymérisation. Cette observation confirme une étude réalisée sur les réactions de formation de xylose, furfural et autres sous-produits à partir de xylanes [180]. La réaction de dégradation des pentoses en furfural semble être plus facile que celle des hexoses en HMF.
De plus, l'utilisation d'acide pour catalyser la réaction de dépolymérisation est indispensable pour obtenir de bons résultats. A faibles température, l'ajout d'acide favorise la dépolymérisation mais pas la dégradation des monosaccharides. Cela avait déjà été observé, toujours dans la même étude [180]. La réaction transformant le HMF en acide lévulinique est également catalysée par l'ajout d'acide.

Les sévérités des extractions, sous forme de facteur H, P ou de sévérité combinée, n'ont pas été utilisées jusqu'ici même si elles permettraient en théorie de comparer toutes les hydrolyses ensembles. Elles ne s'avèrent en effet pas adaptées aux hydrolyses secondaires. La Figure 51 montre les concentrations obtenues avec les hydrolyses sans ajout d'acide en fonction du facteur H (un résultat identique serait obtenu avec le facteur P). Les points devraient quasiment se superposer si l'utilisation du facteur H était pertinente. De même, toutes les extractions pourraient être comparées entre elles avec la sévérité combinée, qui inclut le pH final de l'extraction (Figure 52). Ici aussi, les points devraient se superposer, ce qui n'est pas le cas, notamment pour les hydrolyses acides menées à 120°C et 160°C. La sévérité combinée n'est

donc pas, elle non plus, pertinente. C'est pourquoi dorénavant ces sévérités ne seront pas utilisées pour l'étude des hydrolyses secondaires.

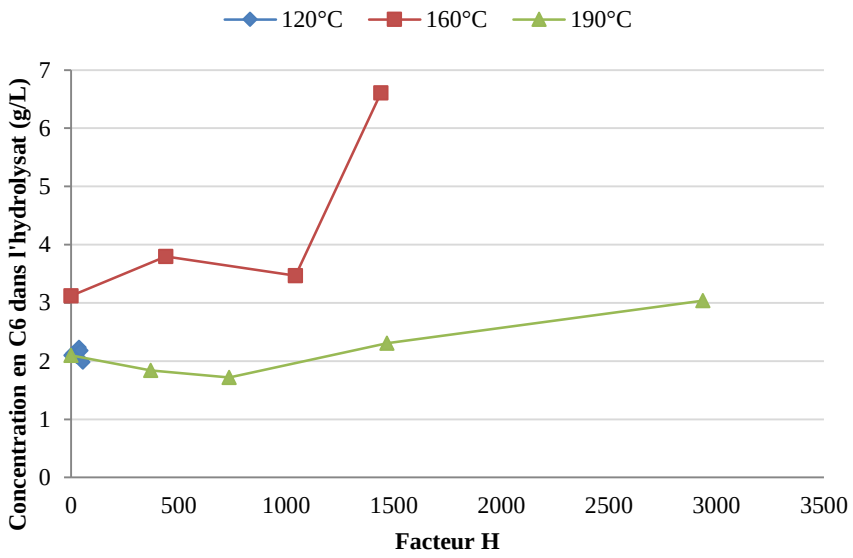


Figure 51 : Concentrations en hexoses obtenues en fonction du facteur H pour les hydrolyses secondaires sans ajout d'acide

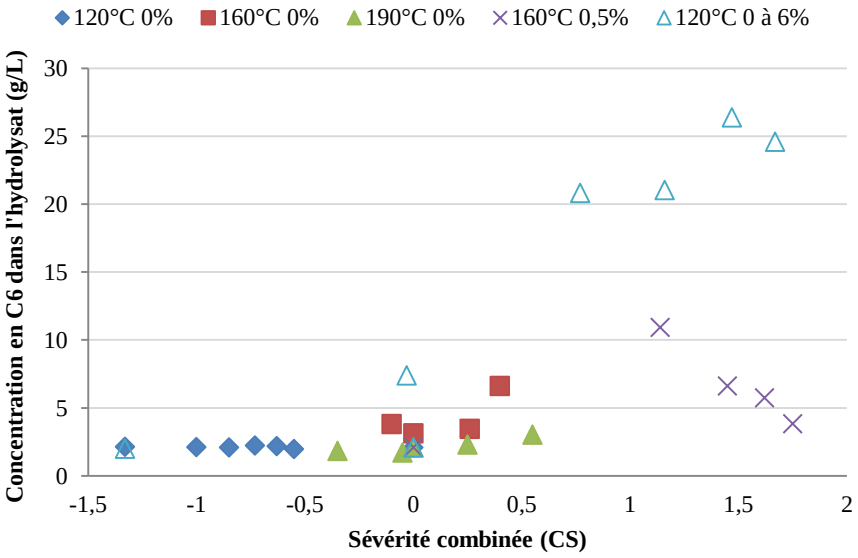


Figure 52 : Concentrations en hexoses obtenues en fonction de la sévérité combinée pour l'ensemble des hydrolyses effectuées

1.2 Optimisation de l'hydrolyse secondaire

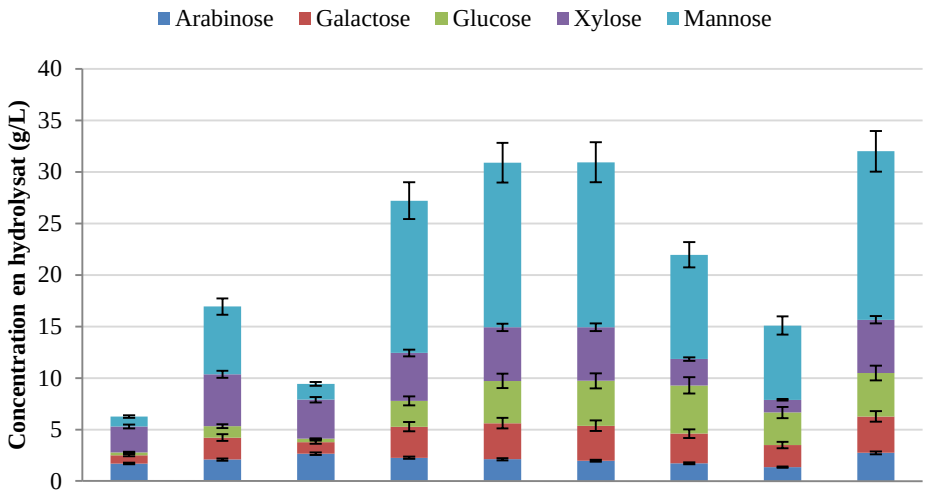
1.2.1 Plan d'expériences

Les expériences préliminaires ont permis de déterminer les plages optimales concernant la durée, la température et la concentration en acide sulfurique. Les conditions retenues sont de 100—140°C, 30—90 min et 0,5—4% (w/w) d'acide sulfurique. Un plan d'expérience prenant en compte les interactions entre les trois variables, constitué de neuf essais, a été réalisé. Les paramètres des différents essais sont regroupés dans le Tableau 28.

N° essai	% H_2SO_4 (w/w)	Durée (min)	Température (°C)
1	0,5	30	100
2	4	30	100
3	0,5	90	100
4	4	90	100
5	0,5	30	140
6	4	30	140
7	0,5	90	140
8	4	90	140
9 ;10 et 11	2,25	60	120

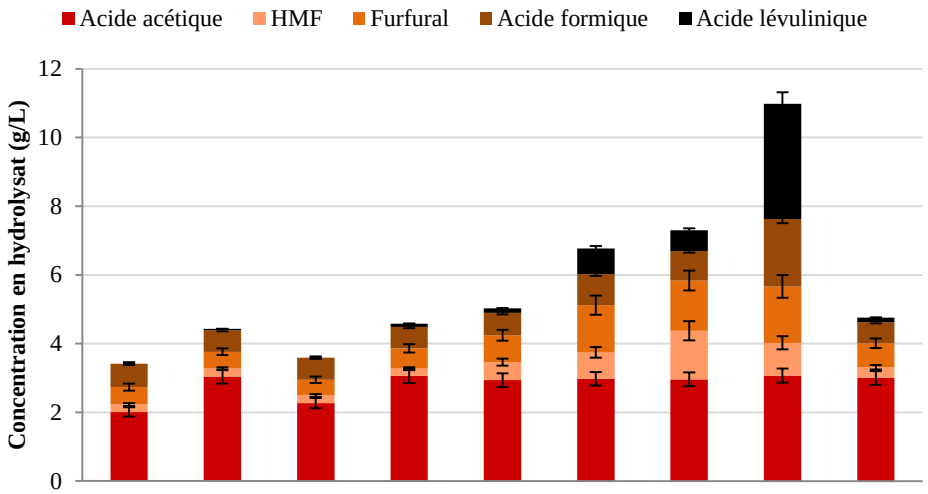
Tableau 28 : Matrice d'expériences pour l'optimisation de l'hydrolyse secondaire

Les concentrations en saccharides et inhibiteurs sont données par les Figure 53 et 54. Les essais confirment les observations préalables. La sévérité augmente quand la durée, la température ou la concentration en acide s'accroissent. Ainsi, une température de 100°C nécessite des temps longs et de fortes concentrations en acides, comme l'essai n°4. *A contrario,* les essais de seulement 30 minutes ne permettent pas de libérer l'ensemble des groupes acétyles, la concentration en acide acétique mesurée étant plus faible que pour les autres essais.
A 140°C, la durée ou la concentration en acide doivent être restreintes pour limiter la dégradation des saccharides. Ainsi, les essais 5 et 6, d'une durée de 30 min, permettent d'obtenir d'excellentes concentrations en monomères. Néanmoins, l'essai 6, effectué avec une quantité supérieure d'acide sulfurique, entraîne l'apparition importante de sous-produits. Les essais à 140°C plus sévères provoquent d'importantes augmentations d'inhibiteurs, notamment en acides formique et lévulinique.
Les essais les plus concluants sont donc les n°4, 5 et l'essai au milieu 9, qui semblent offrir de bons compromis. L'essai n° 5 a l'avantage de nécessiter moins d'acide et ainsi de limiter l'utilisation de produits chimiques pour ajuster le pH de la fermentation dans un second temps.



Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9*
Température (°C)	100	100	100	100	140	140	140	140	120
Durée (min)	30	30	90	90	30	30	90	90	60
% H_2SO_4 (w/w)	0,5	4	0,5	4	0,5	4	0,5	4	2,25
pH final	1,36	0,74	1,38	0,82	1,14	0,96	1,33	0,83	1,07
Hexoses (g/L)	2,1	9,8	3,0	20,3	23,6	23,8	17,7	15,5	24,1
Saccharides tot. (g/L)	6,3	16,9	9,4	27,2	30,9	30,9	22,0	15,0	32,0

Figure 53 : Concentrations en saccharides, en hexoses et pH finaux pour les neufs essais. *moyenne des essais 9, 10 et 11



Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9*
Température (°C)	100	100	100	100	140	140	140	140	120
Durée (min)	30	30	90	90	30	30	90	90	60
% H_2SO_4 (w/w)	0,5	4	0,5	4	0,5	4	0,5	4	2,25

Figure 54 : Concentrations en acide acétique, HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique pour les neufs essais. *moyenne des essais 9, 10 et 11

L'objectif initial de ce plan d'expérience était de déterminer un modèle donnant les concentrations de chaque constituant en fonction de la température, de la durée et de la concentration en acide sulfurique (ou du pH). Le nombre d'expériences permettait de prendre en compte les interactions, mais pas les effets quadratiques. Malheureusement, les résultats obtenus ne se sont pas révélés concluants, certainement du fait de la complexité des réactions mises en jeu. De plus, les intervalles choisis étaient peut-être trop étendus. Les essais obtenus serviront donc de référence, tout en gardant à l'esprit que des paramètres intermédiaires pourraient donner de meilleurs résultats.

1.2.2 Comparaisons avec les essais précédents

Le traitement en deux étapes autohydrolyse/hydrolyse secondaire a été retenu car il pourrait limiter la production d'espèces inhibitrices, par rapport à l'hydrolyse acide. Comme précédemment, les concentrations en inhibiteurs ont été ramenées à des valeurs qui seraient obtenues pour des hydrolysats contenant 100 g/L d'hexoses. Ainsi, les différents hydrolysats peuvent être comparés entre eux. Ces données sont résumées dans le Tableau 29. L'ensemble des traitements secondaires prometteurs permettent de réduire drastiquement les concentrations en inhibiteurs, à l'exception de l'acide acétique, qui est inévitable, ne provenant pas de la dégradation des sucres mais de la désacétylation des hémicelluloses. Les teneurs en HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique sont divisées par plus de 4 ; 2,3 ; 2,5 et 2,7 respectivement pour les essais n° 4, 5, 9 ainsi que pour la référence. L'essai n°6, qui n'a pas été jugé prometteur car contenant plus d'inhibiteurs est encore loin des concentrations mesurées dans l'hydrolysat acide, si ce n'est pour l'acide lévulinique, dont la haute concentration est due au pH très bas du traitement.

	Hexoses	HMF*	Furfural*	Acide acétique*	Acide formique*	Acide lévulinique*
Hydrolyse acide	33,9 ± 1,4	8,8 ± 2,4	7,9 ± 2,5	13,4 ± 1,5	9,6 ± 0,1	2,5 ± 0,4
Essai n°4	20,3 ± 1,3	1,1 ± 0,24	2,9 ± 0,8	14,1 ± 2,6	3,1 ± 0,5	0,5 ± 0,1
Essai n°5	23,6 ± 1,5	2,2 ± 0,5	3,3 ± 0,9	12,5 ± 2,1	2,7 ± 0,4	0,6 ± 0,1
Essai n°6	23,7 ± 1,5	3,2 ± 0,7	5,8 ± 1,6	12,5 ± 2,1	3,8 ± 0,6	3,2 ± 0,5
Essai n°9	24,1 ± 1,6	1,3 ± 0,3	2,9 ± 0,8	12,5 ± 2,12	2,6 ± 0,4	0,5 ± 0,1
Référence	24,6 ± 1,5	1,4 ± 0,4	3,3 ± 0,9	13,1 ± 2,7	2,9 ±0,5	0,9 ± 0,1

Tableau 29 : Concentrations (g/L) en hexoses obtenues après chaque traitement et concentrations en inhibiteurs *Concentrations ramenées à 100 g/L d'hexoses

Une autre donnée importante à prendre en considération est la consommation d'acide sulfurique. Le Tableau 30 donne ces consommations par rapport au bois de départ, dans les conditions opératoires précédentes. Ainsi, les consommations sont toujours supérieures à celles utilisées lors de l'hydrolyse acide. L'essai n° 5, qui est le plus économe en ne requérant qu'une concentration de 0,5% (w/w) en solution, nécessite 30% d'acide en plus. Cependant, ces consommations pourraient être fortement réduites si l'hydrolyse secondaire était effectuée sur un hydrolysat après qu'il ait été concentré.

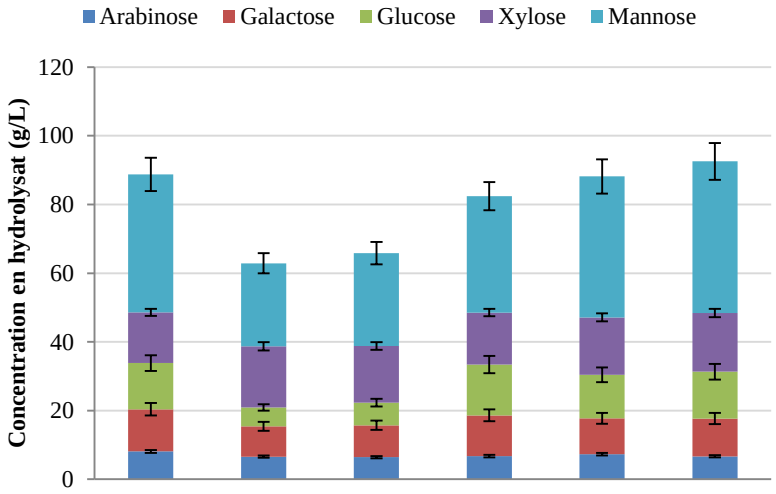
	H_2SO_4 (g pour 100 g de bois)
Hydrolyse acide	1,0
Essai n°4	10,7
Essai n°5	1,3
Essai n°6	10,7
Essai n°9	5,9
Référence	10,7

Tableau 30 : Consommations en acide sulfurique nécessaires aux différents traitements, calculées en considérant que 65% de l'hydrolysat est extrait des copeaux et subit l'hydrolyse secondaire

1.2.3 Application à un hydrolysat concentré

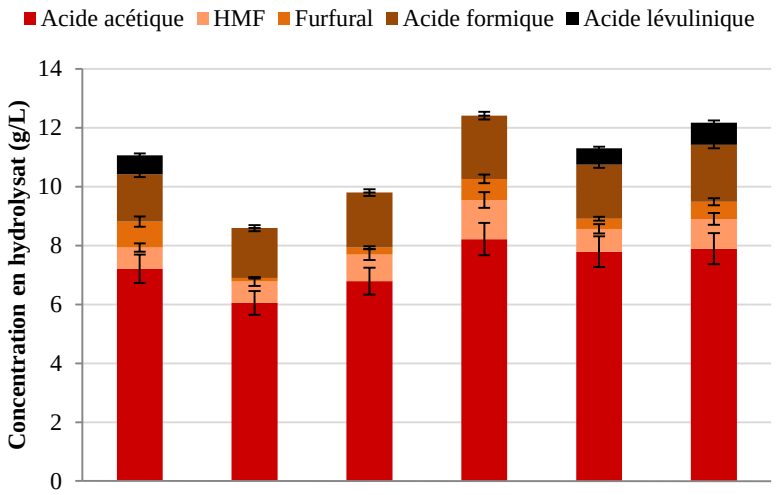
Des essais similaires ont ainsi été menés sur des hydrolysats d'autohydrolyses concentrés trois fois par évaporation. Lors de ce traitement, une partie de l'acide acétique et la totalité du furfural ont été perdus dans les vapeurs. Des hydrolyses secondaires suivant les paramètres des essais 5 et 9 du plan d'expérience (voir ci-dessus) ont été menées (Figure 55 et 56). Comparées aux résultats de référence obtenus, les dépolymérisations n'étaient pas totales. Deux raisons peuvent être avancées. Tout d'abord, la quantité d'oligomères à hydrolyser est plus conséquente. Ensuite, raison plus importante, les composants des hydrolysats ont un effet tampon sur le pH. Ainsi, pour une même quantité d'acide ajoutée, le pH final de l'essai 5 concentré est de 1,6, contre 1,1 lors de l'essai sur l'hydrolysat dilué. L'hydrolyse est donc plus lente. Les essais ont alors été prolongés de 30 min (5 bis et 9 bis), et 60 min (5 ter, qui correspond à l'essai 7 du plan d'expériences). Pour les deux essais les plus longs, les concentrations en saccharides mesurées étaient équivalentes à celles de la référence, qui correspondent également aux concentrations attendues au regard des quantités d'eau évaporées. En ce qui concerne les produits de dégradation, ils sont bien entendu plus élevés que lors des essais précédents, cependant les

proportions entre ces produits et les saccharides sont sensiblement identiques, malgré les durées de traitement plus longues.



Essai	Norme	5	5 bis	5 ter (7)	9	9 bis
Température (°C)	120	140	140	140	120	120
Durée (min)	60	30	60	90	60	90
% H_2SO_4 (w/w)	4	0,5	0,5	0,5	2,25	2,25
pH final	-	1,62	1,62	1,63	0,70	0,87
Hexoses (g/L)	65,8	38,4	43,0	60,5	64,2	68,8
Saccharides tot. (g/L)	88,7	62,9	65,9	82,4	88,2	92,5

Figure 55 : Concentrations en saccharides, en hexoses et pH final pour les essais à partir d'hydrolysats concentrés



Essai	Norme	5	5 bis	5 ter (7)	9	9 bis
Température (°C)	120	140	140	140	120	120
Durée (min)	60	30	60	90	60	90
% H_2SO_4 (w/w)	4	0,5	0,5	0,5	2,25	2,25

Figure 56 : Concentrations en acide acétique, HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique pour les essais à partir d'hydrolysats concentrés

Pour comparer ces résultats avec les précédents, les concentrations en inhibiteurs ont été calculées pour des hydrolysats contenants 100 g/L d'hexoses, comme précédemment (Tableau 31). De plus, les quantités de furfural et d'acide acétique perdues pendant la concentration de l'hydrolysat par évaporation ont été ajoutées aux quantités mesurées après les hydrolyses secondaires. Cela permet d'évaluer l'impact des hydrolyses secondaires si un procédé de concentration différent, ne conduisant pas à l'élimination de ces composés, était utilisé. Il s'avère que les concentrations en inhibiteurs sont similaires, que le traitement soit appliqué avant ou après la concentration. En général, les concentrations en furfural semblent cependant légèrement plus faibles. La série d'essai n°5 produit d'avantage d'espèces inhibitrices que la série d'essais 9, comme il avait déjà été observé sur des hydrolysats non concentrés. Le fait de prolonger les traitements 5 et 9 n'a pas d'effet négatif majeur sur les concentrations en inhibiteurs

L'hydrolyse secondaire peut donc être pratiquée sur un hydrolysat concentré. Cela a l'avantage de réduire drastiquement les consommations en acide sulfurique, même si le pH est finalement plus élevé. Ainsi, le traitement n°5 ne nécessite que 0,45 g d'acide pour 100 g de bois, contre 2,0 g concernant l'essai n°9. Pour rappel, l'hydrolyse acide requiert 1 g pour 100 g de bois. Le traitement n°5 devient donc plus « économe » que l'hydrolyse acide.

		Hexoses	HMF*	Furfural*	Acide acétique*	Acide formique*	Acide lévulinique*
Essais non concentrés	Hydrolyse acide	33,9 ± 1,4	8,8 ± 2,4	7,9 ± 2,5	13,4 ± 1,5	9,6 ± 0,1	2,5 ± 0,4
	Essai n°5	23,6 ± 1,5	2,2 ± 0,5	3,3 ± 0,9	12,5 ± 2,1	2,7 ± 0,4	0,6 ± 0,1
	Essai n°6	23,7 ± 1,5	3,2 ± 0,7	5,8 ± 1,6	12,5 ± 2,1	3,8 ± 0,6	3,2 ± 0,5
	Essai n°9	24,1 ± 1,6	1,3 ± 0,3	2,9 ± 0,8	12,5 ± 2,1	2,6 ± 0,4	0,5 ± 0,1
	Norme	24,6 ± 1,5	1,4 ± 0,4	3,3 ± 0,9	13,1 ± 2,7	2,9 ±0,5	0,9 ± 0,1
Essais concentrés	Essai n°5	38,4 ± 2,5	1,9 ± 0,4	0,3 ± 0,1	15,7 ± 2,7	4,4 ± 0,7	n.d.[2]
	Essai n°5 bis	42,9 ± 2,8	2,1 ± 0,5	0,6 ± 0,2	15,8 ± 2,7	4,4 ± 0,7	n.d. [2]
	Essai n°5 ter	60,5 ± 3,9	2,2 ± 0,5	1,2 ± 0,3	13,6 ± 2,3	3,6 ± 0,6	n.d. [2]
	Essai n°9	64,2 ± 4,2	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,2	12,1 ± 2,1	2,9 ± 0,5	n.d. [2]
	Essai n°9 bis	68,7 ± 4,5	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,5	11,5 ± 2,0	2,8 ± 0,5	0,9 ± 0,1
	Norme	65,8 ± 4,2	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,4	11,0 ± 1,9	2,5 ± 0,4	1,1 ± 0,2
Avec l'acide acétique et le furfural perdus lors de l'évaporation[1]	Essai n°5	38,4 ± 2,5	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,4	16,8 ± 2,9	4,4 ± 0,7	n.d. [2]
	Essai n°5 bis	42,9 ± 2,8	2,1 ± 0,5	1,6 ± 0,5	16,7 ± 2,9	4,4 ± 0,7	n.d. [2]
	Essai n°5 ter	60,5 ± 3,9	2,2 ± 0,5	2,0 ± 0,6	14,3 ± 2,5	3,6 ± 0,6	n.d. [2]
	Essai n°9	64,2 ± 4,2	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,6	12,8 ± 2,2	2,9 ± 0,5	n.d. [2]
	Essai n°9 bis	68,7 ± 4,5	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,4	12,1 ± 2,1	2,8 ± 0,5	0,9 ± 0,1
	Norme	65,8 ± 4,2	1,1 ± 0,3	2,0 ± 0,6	11,6 ± 2,0	2,5 ± 0,4	1,1 ± 0,2

Tableau 31 : Concentrations (g/L) en hexoses et en inhibiteurs obtenues après chaque traitement, pour les hydrolysats directs et les hydrolysats concentrés *Concentrations ramenées à 100 g/L d'hexoses [1]Les quantités de furfural et d'acide acétique perdues lors de l'évaporation ont été ajoutées aux valeurs mesurées [2]Les concentrations en acide acétique sont trop élevées pour détecter de faibles concentrations en acide lévulinique (cf. chapitre V, partie D.2)

2 Hydrolyse secondaire des hydrolysats par voie enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses est encore hypothétique (cf. chapitre I, partie B.3.4). Une enzyme ne peut catalyser l'hydrolyse que d'un type seul de liaison. Or, les hémicelluloses contiennent un grand nombre de liaisons différentes, nécessitant donc un nombre important d'enzymes. Néanmoins, une hydrolyse enzymatique efficace serait un traitement idéal à la suite d'une autohydrolyse. Comparé à une hydrolyse acide, elle permettrait d'éviter la dégradation des saccharides. De plus, certaines enzymes fonctionnent à un pH proche du pH optimal des levures de fermentation, et évitent le chute de pH due à l'hydrolyse acide, qui nécessite de consommer des produits chimiques pour le rehausser. D'autre part, dans le cas d'une hydrolyse secondaire, l'utilisation d'enzymes est plus aisée que lors d'une hydrolyse de

biomasse solide : les hémicelluloses, solubilisées, sont facilement accessibles et la lignine, qui inhibe l'action des enzymes, est présente en plus faible quantité.
Des essais ont été effectués sur un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse. Il contient donc, en plus des saccharides et de leurs produits de dégradation, de la lignine soluble ainsi que de la lignine précipitée. Deux types d'enzymes commerciales ont été utilisés : Mannaway et Celluclast. La solution de Mannaway ne contient qu'une seule enzyme, une mannanase, alors que la Celluclast est composée de cellulases accompagnées d'autres enzymes produites par *Trichoderma reesei* ATCC 26921, dont probablement des hémicellulases. Les plages de pH de fonctionnement de ces deux enzymes sont très différentes, rendant difficile leur utilisation simultanée (pH idéal de 8 pour la mannanase et de 5,5 pour la Celluclast).
Ces deux types d'enzymes ont été utilisés séparément ainsi que successivement. Un essai a également été effectué avec les deux types simultanément, à un pH intermédiaire.

2.1 Comparaison de l'efficacité des deux types d'enzymes

Les deux types d'enzymes ont été utilisés sur un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse, tamponné au pH optimal pour chacune. Pour ces essais exploratoires, les quantités d'enzymes utilisées, par rapport à la biomasse à hydrolyser, sont dix fois supérieures à celles habituellement utilisées d'après le fabriquant (cf. chapitre V, partie B.3.2) L'hydrolyse a été effectuée durant 48h, avec des prélèvements après 4h et 24h.
Les concentrations en monomères de chaque saccharide ont été mesurées dans les hydrolysats (Figure 57). Les concentrations en xylose et glucose augmentent sous l'action de la Celluclast. Sa teneur en hémicellulases est donc confirmée, notamment sous la forme d'endo-1,4-β -xylanases. Les xylanes présents dans l'hydrolysat utilisé sont en grande partie constituées de chaines de xyloses, l'arabinose se retrouvant presque entièrement sous forme monomère à la fin de l'autohydrolyse (cf. chapitre II, partie B.1 et Figure 58). Ainsi, seul ce type d'enzymes, capable de cliver les liaisons entre unités de xylose, est nécessaire à la dépolymérisation des xylanes. L'action de la Celluclast est relativement lente, puisque la concentration en glucose augmente encore entre 24 et 48h, et ce malgré le surdosage en enzymes. De plus, la dépolymérisation des xylanes n'est pas totale. Après 48h, seuls 68 ± 3,4% des xyloses sont présents sous forme monomère (Figure 58). Les autres saccharides ne voient pas leurs concentrations en monomère augmenter sous l'effet de la Celluclast.
La mannanase n'a qu'un effet limité. Seule la concentration en mannose augmente légèrement pendant les 24 premières heures. Néanmoins, la dépolymérisation est très faible, seuls 23 ± 1,4% du mannose est présent sous forme monomère après 48h d'hydrolyse, pour 17 ± 1,0% initialement. Ce résultat n'est guère surprenant, l'utilisation d'une seule enzyme, donc la rupture d'une seule liaison, peut difficilement aboutir à une dépolymérisation d'oligomères résultant des GGM. Pas moins de cinq types d'enzymes sont nécessaires à leur dépolymérisation totale, deux pour la chaine principale et trois pour les unités galactose et les groupes acétyles [7]. Seuls quelques mannoses placés en bout de chaine ont pu être hydrolysés et libérés grâce à la mannanase. Il est également vraisemblable que la mannanase ait contribué à diminuer fortement le DP des oligomères, sans toutefois obtenir de monomères.

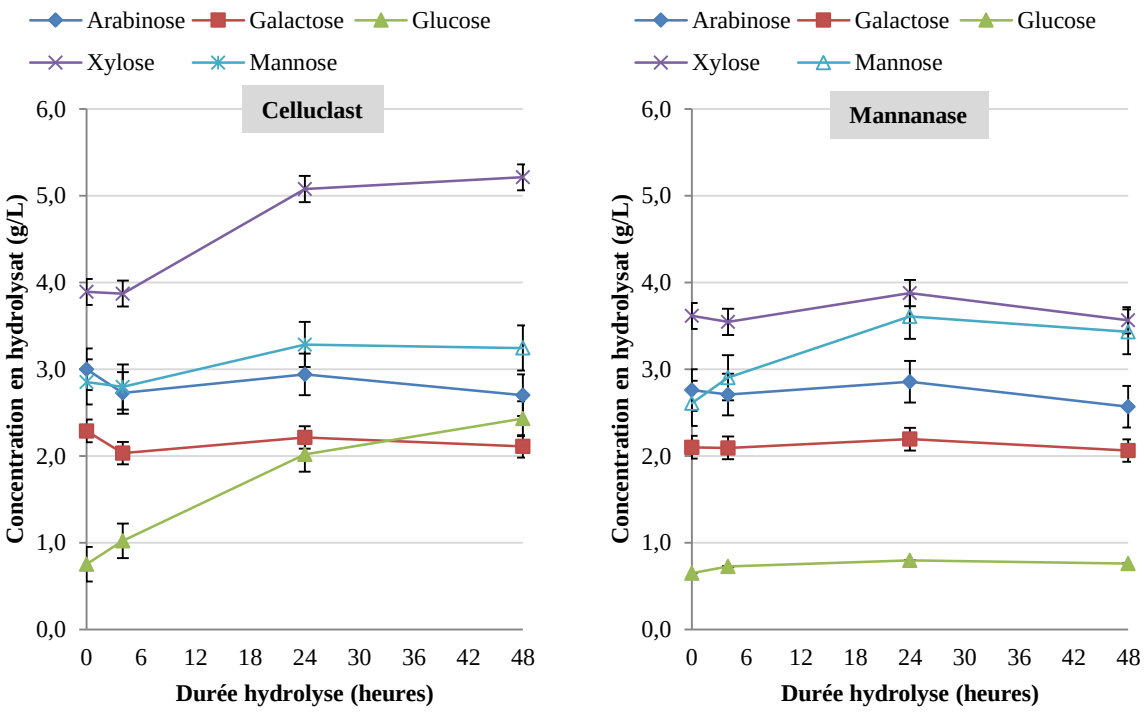


Figure 57 : Concentrations en monosaccharides lors des hydrolyses enzymatiques effectuées avec la Celluclast (gauche) et la mannanase (droite)

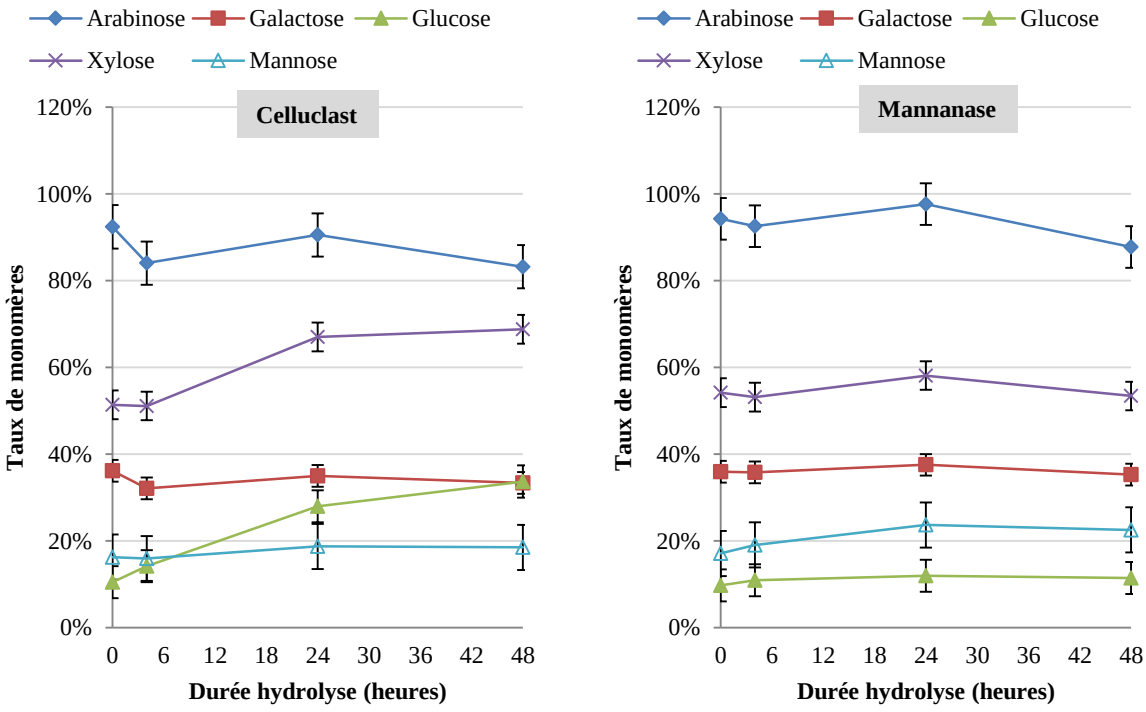


Figure 58 : Taux de monomères pour chaque saccharide lors des hydrolyses enzymatiques effectuées avec la Celluclast (gauche) et la mannanase (droite)

Le taux de monomères obtenu après ces hydrolyses enzymatiques reste relativement faible. Cela ne signifie cependant pas que les enzymes sont totalement inefficaces. Il est possible que les masses molaires des oligomères soient fortement diminuées sans toutefois aboutir à une dépolymérisation totale, certaines enzymes indispensables étant manquantes. Cela a déjà été observé [91]. Seules quelques configurations particulières d'oligomères ont pu aboutir à la libération de monomères.

2.2 Utilisation des enzymes en série

La mannanase et la Celluclast ont été utilisées en série sur l'autohydrolysat. Une première enzyme était appliquée 24 heures, puis l'enzyme suivante était ajoutée également pour 24h, après correction du pH. Deux séquences ont été effectuées : Celluclast puis mannanase et inversement. Afin de pouvoir modifier les pH, les solutions n'étaient pas tamponnées contrairement aux précédents essais. Néanmoins, il a été observé pendant ces essais que le tamponnage ou non de l'hydrolysat n'a pas d'effet véritablement significatif.

Les concentrations en monosaccharides des deux séquences sont données sur la Figure 59 et les taux de monomères sur la Figure 60. Comme vu précédemment, la mannanase permet d'obtenir un peu plus de mannose sous forme monomère, mais n'avait pas d'action après 24h. L'ajout de Celluclast après 24 heures a un effet bénéfique. Comme lors de son utilisation seule, elle permet de libérer du xylose et du mannose. Cependant le taux de monomère obtenu pour le xylose est bien supérieur : 87 ± 5%, contre seulement 69 ± 4% après 48 heures d'hydrolyse avec la Celluclast seule. De plus, la concentration en mannose augmente également alors que la Celluclast seule était incapable d'en produire. Le taux de monomère atteint ainsi 35 ± 2,1%, alors qu'il n'était que de 23 ± 1,4% dans le meilleur des cas jusqu'ici (mannanase après 48h). L'action successive des deux enzymes est donc avantageuse. La mannanase produit certes peu de monomères, mais elle optimise le substrat pour la Celluclast, en réduisant le degré de polymérisation des oligomères. L'action de la Celluclast est alors améliorée, dépolymérisant presque entièrement les xylanes résiduels, ainsi qu'une partie du mannose. La Celluclast contient donc une mannanase, différente de la mannanase composant la Mannaway. Les concentrations obtenues en hexoses restent toutefois modestes, la dépolymérisation est loin d'être totale.
L'effet obtenu avec les deux enzymes est beaucoup moins marqué quand l'ordre de la séquence est inversé. Après l'action de la Celluclast, l'efficacité de la mannanase n'augmente pas. La concentration finale en mannose ou son taux de monomère, est identique à celui obtenu lors de l'utilisation de la mannanase seule.

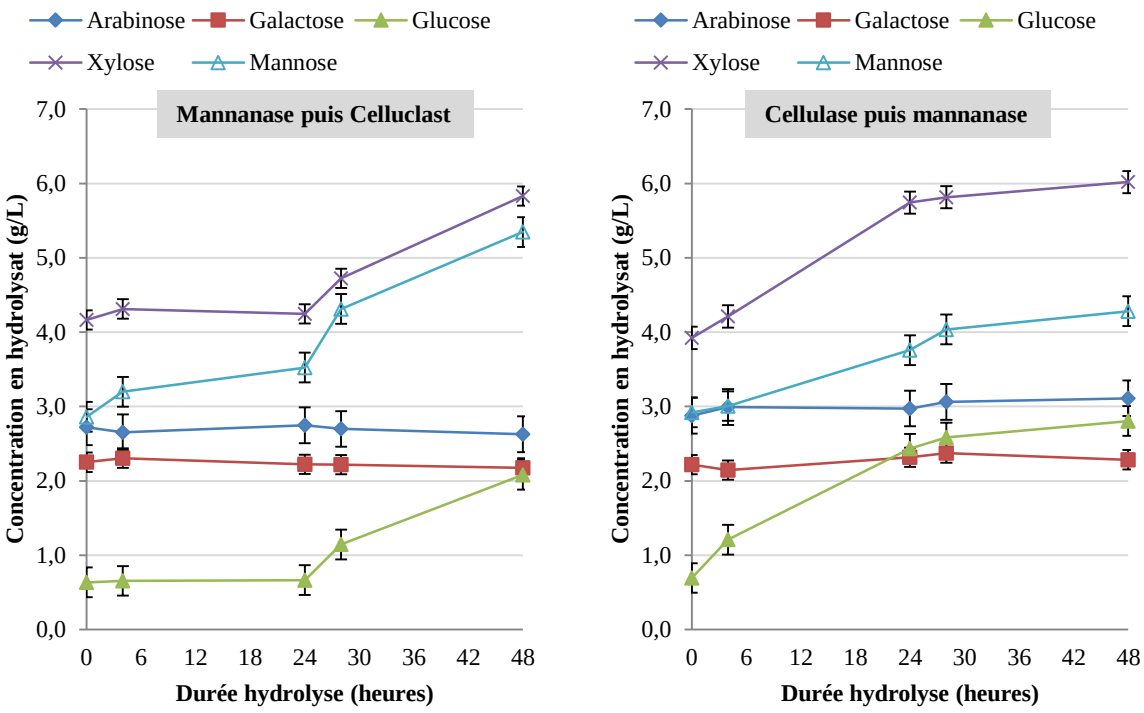


Figure 59 : Concentrations en monosaccharides lors des hydrolyses enzymatiques effectuées selon la séquence mannanase-Celluclast (gauche) et la Celluclast-mannanase (droite)

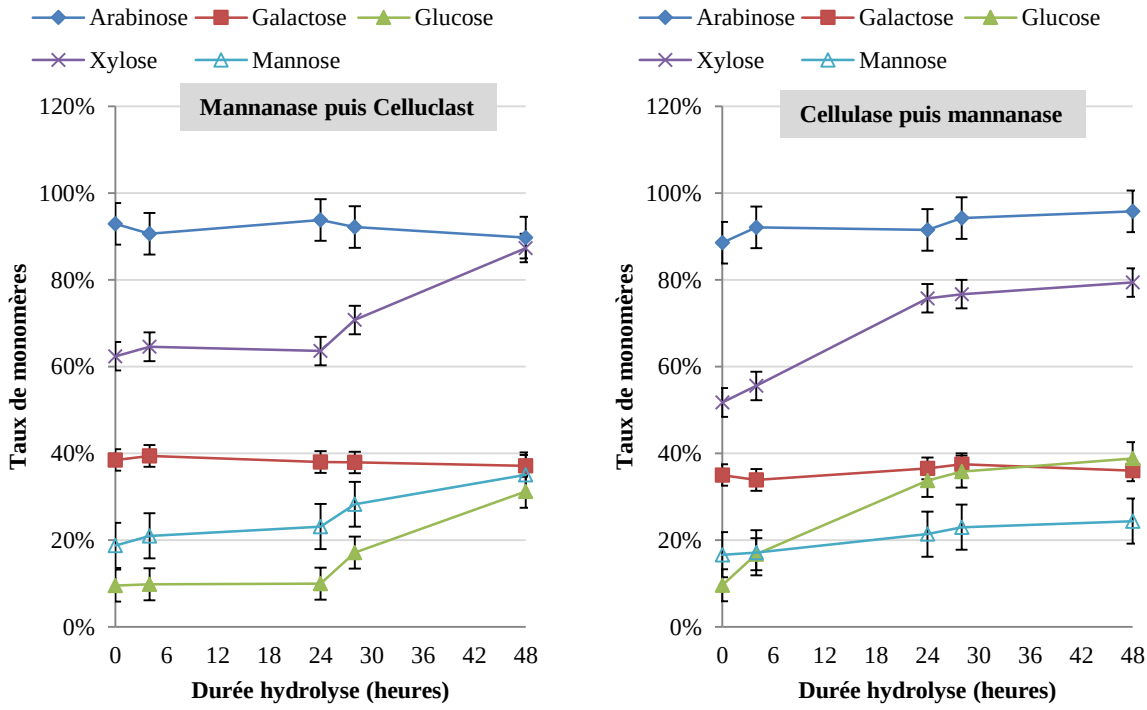


Figure 60 : Taux de monomères pour chaque saccharide monosaccharides lors des hydrolyses effectuées selon la séquence mannanase-Celluclast (gauche) et la Celluclast-mannanase (droite)

2.3 Utilisation des deux enzymes simultanément

Un dernier essai a été réalisé avec les deux enzymes présentes simultanément dans l'hydrolysat. Celui-ci a été tamponné à un pH de 6,5, pH situé entre les deux plages de fonctionnement optimales des enzymes. L'hydrolyse a été effectuée pendant 72 heures. Néanmoins, les concentrations en monosaccharides mesurées (Figure 61) montrent que ce mélange donne de moins bons résultats pour le xylose et le glucose que la Celluclast utilisée seule à son pH de prédilection. Quant au mannose, sa dépolymérisation est similaire à celle obtenue avec la mannanase seule.
La différence de plage de fonctionnement des enzymes constitue un obstacle à leur utilisation simultanée.

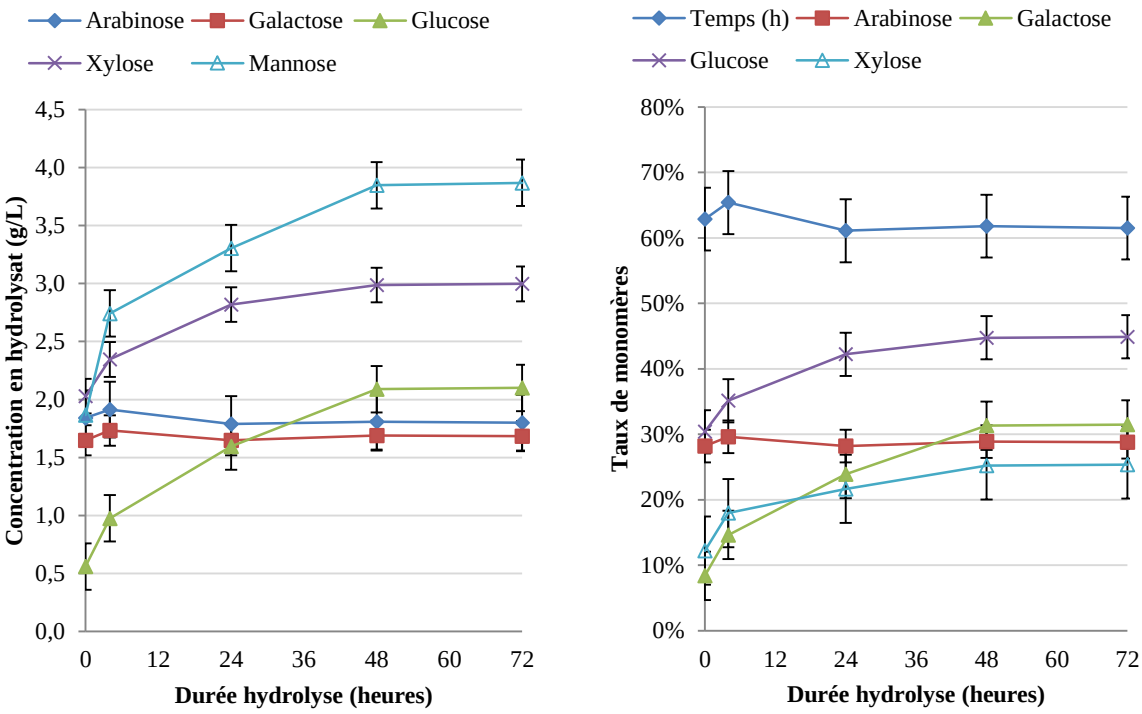


Figure 61 : Concentrations en monosaccharides (gauche) et taux de monomères (droite) de l'hydrolyse enzymatique effectuée avec les deux types d'enzymes simultanément

3 Conclusion sur les hydrolyses secondaires

L'optimisation des hydrolyses secondaires a donc permis de développer un procédé en deux étapes qui s'avère très intéressant comparé à l'hydrolyse acide. De plus, pour rappel, l'autohydrolyse induit moins de dégradation de la cellulose qu'une hydrolyse acide, son inconvénient étant une extraction légèrement plus faible de saccharides.
L'hydrolyse secondaire en milieu acide optimisée permet de fortement limiter la dégradation des saccharides, limitant grandement la présence d'espèces inhibitrices dans le milieu de fermentation. L'hydrolyse secondaire par voie enzymatique n'a pas eu des résultats aussi probants. L'application de ces deux enzymes successivement, la mannanase puis la Celluclast, a certes quasiment permis d'achever la dépolymérisation des xylanes et d'augmenter les concentrations en monomères de glucose et mannose. Néanmoins il reste une grande quantité

d'oligomères dans l'hydrolysat, qui nécessite d'autres hémicellulases pour être totalement dépolymérisée. Ces essais ont cependant permis de démontrer que l'hydrolyse secondaire enzymatique semble possible, malgré la présence de dérivés de lignine.

D. Etude des possibilités d'augmenter la concentration en saccharides de l'hydrolysat

Les résultats précédents ont aboutis à des hydrolysats dont les teneurs en saccharides sont relativement faibles, les hydrolyses étant réalisées en ajoutant de l'eau au bois, ce qui permet néanmoins de récupérer par égouttage environ 65% des sucres solubilisés lorsque le ratio L/B est de 4. La concentration en saccharides peut être un paramètre crucial pour la rentabilité du projet (cf. chapitre I partie C.2.6). Afin de l'augmenter, une évaporation flash (ou évaporation par détente) peut être effectuée [78]. Ce procédé, s'il n'est pas suffisant, peut être suivi par une évaporation plus poussée [71]. Ce dernier procédé a été appliqué sur des hydrolysats d'autohydrolyses. Un autre moyen d'augmenter la concentration en sucres est de modifier le procédé d'autohydrolyse en diminuant le ratio L/B et ou en recyclant l'hydrolysat.

1 Effet de l'évaporation flash

Une évaporation flash est très efficace et sans réel coût énergétique. Elle peut être réalisée après une extraction à haute température, comme les hydrolyses acides ou autohydrolyses par exemple. En ramenant l'hydrolysat à pression atmosphérique, donc à 100°C, dans un réservoir appelé *flash tank*, l'énergie gagnée permet d'en vaporiser une partie. Ce procédé est utilisé dans les usines kraft sur la liqueur noire à la fin de l'extraction. L'objectif n'est alors pas tant de concentrer la liqueur noire que de produire de la vapeur. Une rapide étude thermodynamique permet d'évaluer le potentiel de ce procédé. A la fin de l'extraction des hémicelluloses, l'hydrolysat est considéré comme étant entièrement sous forme liquide à 170°C. C'est notamment le cas si le ratio L/B est de 4. De plus, étant en grande majorité composé d'eau, il est considéré que les données thermodynamiques relatives à l'eau peuvent s'appliquer à l'hydrolysat.
Quand l'hydrolysat passe brutalement de 170°C à 100°C, l'enthalpie gagnée permet d'en évaporer une partie. D'après les données thermodynamiques (Tableau 32), l'enthalpie dégagée en refroidissant ainsi 1 kg d'eau est de 300 kJ. Convertie en enthalpie de changement d'état, cela permet d'évaporer 132 g d'eau. En évaporant ainsi 13% d'hydrolysat, celui-ci est concentré d'un facteur 1,15. L'efficacité est donc modérée, ce qui explique que ce procédé est utilisé pour récupérer de la vapeur mais pas réellement pour concentrer. Néanmoins, cette augmentation en concentration est « gratuite ». De plus, cette évaporation permet d'éliminer une partie des inhibiteurs, notamment les acides acétique, formique ainsi que le furfural (cf. chapitre I partie C.2.3).

Température (°C)	Enthalpie phase gazeuse (kJ/kg)	Enthalpie phase liquide (kJ/kg)	Enthalpie de changement d'état (kJ/kg)
160	2675,6	419,17	2256,43
170	2767,9	719,08	2048,82

Tableau 32 : Données thermodynamiques de l'eau à 160 et 170°C (d'après [181])

2 Effet de l'évaporation

Une évaporation plus poussée que l'évaporation flash peut être effectuée en complément. Un tel procédé a été appliqué sur un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse pour le concentrer 3 et 10 fois à 70°C et une pression de 35 kPa. L'hydrolysat concentré trois fois a été utilisé ensuite pour les essais d'hydrolyses secondaires sur un hydrolysat concentré (cf. partie C.1.2.3 de ce chapitre).

Deux phases sont obtenues lors de l'évaporation : l'hydrolysat concentré et le distillat. Les compositions de ces deux phases sont données sur la Figure 62 pour l'hydrolysat concentré trois fois, et sur la Figure 63 pour l'hydrolysat concentré dix fois. Dans la majeure partie des cas, les saccharides sont conservés dans l'hydrolysat même si une légère perte semble être observée concernant le xylose. Aucune dégradation ne devrait pourtant avoir lieu à cette température.

L'acide acétique, l'acide formique, le furfural et même le HMF sont susceptibles de se retrouver dans les vapeurs. Lors des deux concentrations, le furfural est entièrement éliminé. Concernant les autres inhibiteurs, l'évaporation doit vraiment être poussée pour extraire des quantités importantes. Seulement 39 ± 4% de l'acide acétique part dans les vapeurs en concentrant trois fois. Ce chiffre passe à 66% ± 7% en concentrant dix fois. Le même comportement est observé en ce qui concerne l'acide formique, dont la perte ne représente que 22 ± 3% en concentrant trois fois, mais est totale lorsque l'on concentre 10 fois. Pour finir, le HMF éliminé passe de 23 ± 3% à 73 ± 8%.

Pour conclure, l'évaporation est un procédé simple qui permet de concentrer les saccharides en évitant d'en perdre, mais également d'éliminer en partie ou totalement l'acide acétique, l'acide formique, le furfural et le HMF dans les vapeurs. Ces composés pourraient être purifiés, par distillation par exemple, et être vendus par la bioraffinerie. Pour en extraire une partie conséquente, il est toutefois indispensable de fortement concentrer l'hydrolysat.

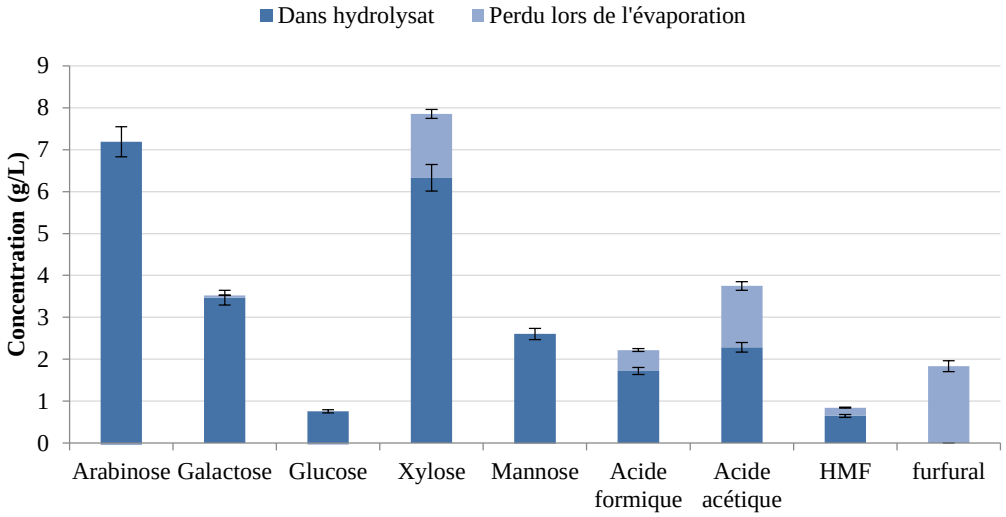


Figure 62 : Compositions des deux phases après avoir concentré trois fois un hydrolysat résultant d'une d'autohydrolyse

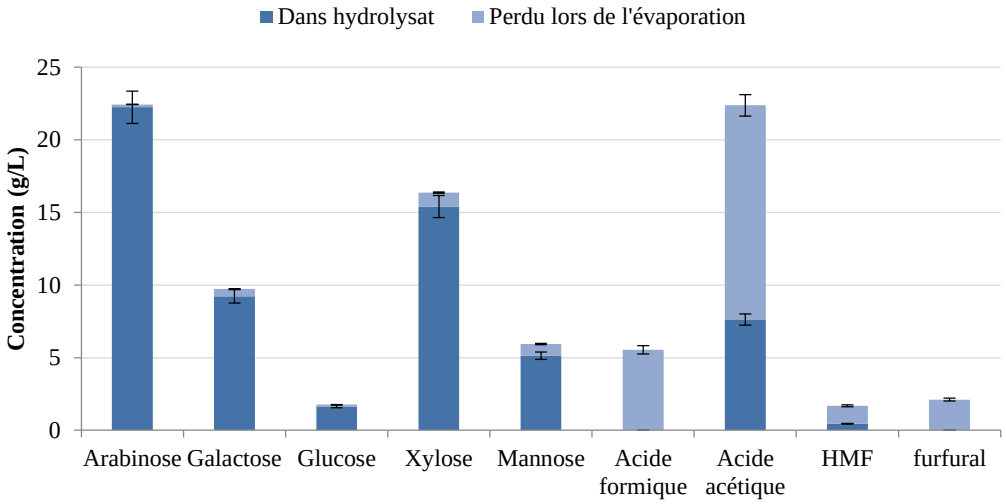


Figure 63 : Compositions des deux phases après avoir concentré dix fois un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse

3 Effet du ratio Liqueur sur bois

Diminuer le ratio L/B, soit la proportion de liqueur ajoutée par rapport au bois, devrait permettre de concentrer l'hydrolysat en saccharides pendant la phase d'extraction. Afin d'évaluer l'impact de la diminution du ratio L/B (entre 4 et 2), des essais ont été effectués lors d'une autohydrolyse. Les autres paramètres utilisés sont les mêmes que ceux de l'autohydrolyse 170 utilisée dans la partie B.1 de ce chapitre (température : 170°C, durée de montée en température : 30 min, durée à température : 65 min, durée de descente en température : 10 min).

3.1 Composition des hydrolysats

Les concentrations en saccharides, acide acétique, HMF, furfural et acide formique sont données sur la Figure 64. Les concentrations en saccharides, acide acétique et acide formique évoluent proportionnellement au ratio L/B. Ainsi, quand le ratio L/B est réduit de 4 à 2, la concentration en hexoses est multipliée par deux, passant de 22,9 ± 1,4 à 45,3 ± 2,9 g/L, celle en pentoses de 7,2 ± 0,7 g/L à 14,3 ± 1 ,5 g/L, celle en acide acétique de 1,05 ± 0,1 g/L à 2,15 ± 0,1 g/L et celle d'acide formique de 0,51 ± 0,3 g/L à 1,0 ± 0,1 g/L. Une telle proportion peut ne pas être observée quand le ratio L/B devient très faible, à partir de 1,3 à 1,6. Cette valeur seuil dépend en outre de la taille des copeaux (ou particules) utilisée [55].
Concernant les furanes, le comportement est légèrement différent. La concentration en furfural semble augmenter entre des ratios L/B de 4 à 3, puis être stable pour des ratios L/B situés entre 3 et 2. La concentration en HMF passe de 0,16 ± 0,03 à 0,51 ± 0,10 g/L quand le ratio L/B est réduit de 4 à 2. Cela doit s'expliquer par les faibles concentrations mesurées pour ces espèces.
Ces observations sont identiques après avoir effectué une hydrolyse secondaire (Figure 65).
Diminuer le ratio L/B permet donc d'augmenter les concentrations en saccharides, sans toutefois accentuer l'extraction des hémicelluloses, ni leur dégradation.

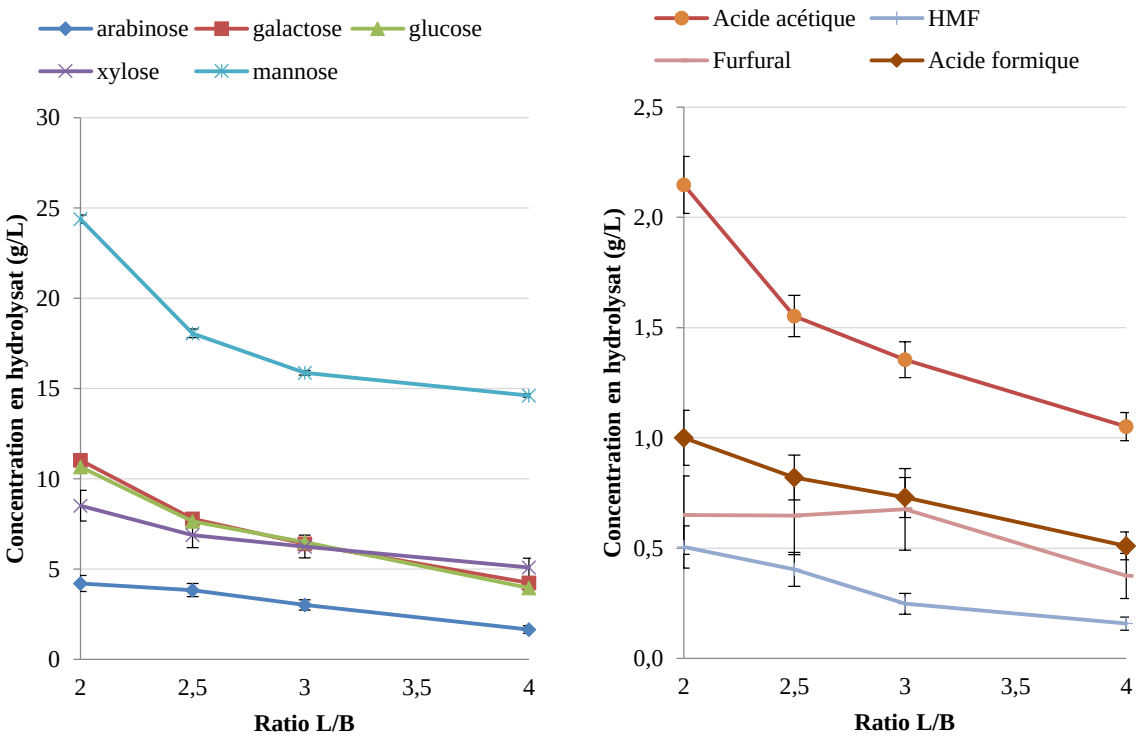


Figure 64 : Concentration en saccharides (monomères et oligomères cumulés, à gauche) et inhibiteurs (à droite) mesurées dans des hydrolysats résultants d'autohydrolyses effectuées selon différents ratio L/B

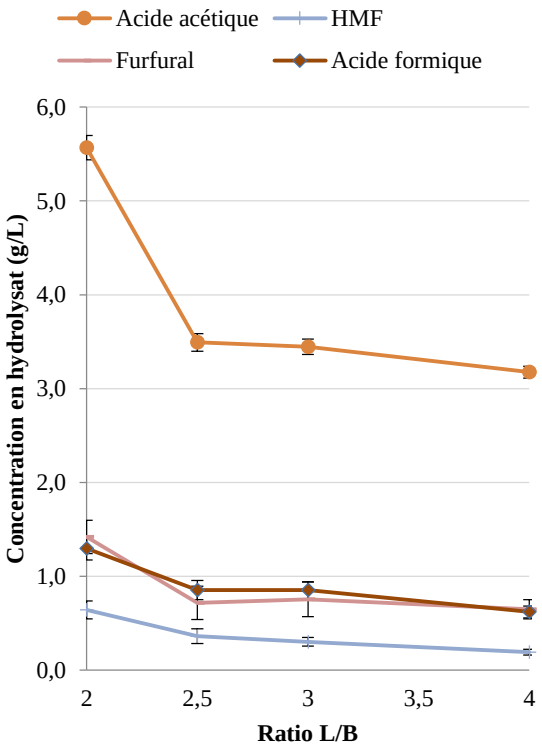


Figure 65 : Concentration en inhibiteurs mesurées après une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire (4% d'H_2SO_4 à 120°C pendant 60 min) effectuées selon différents ratio L/B

3.2 Saccharides effectivement disponibles à la fermentation

La quantité de saccharides extraite est identique quel que soit le ratio L/B. Néanmoins, la quantité disponible à la fermentation, en g pour 100 g de bois, décroit quand le ratio L/B diminue. En effet, après la simple filtration appliquée à la fin de l'autohydrolyse, l'humidité des copeaux est de 65 ± 2%, ce qui signifie que pour 100 g de copeaux en début de procédé, 135 mL d'hydrolysat restent piégés dans les copeaux. En admettant que la composition de l'hydrolysat restant dans les copeaux est la même que celle de l'hydrolysat récupéré, les quantités d'hexoses et pentoses effectivement extraites chutent de plus de moitié (Figure 66). Dans ce cas les productions potentielles en éthanol, pour 100 g de bois, seraient d'environ 2,3 g, 2,1 g, 1,8 g et 1,0 g pour des ratios L/B de 4, 3, 2 et 2,5 respectivement.
Ces productions pourraient être améliorées en optimisant la quantité d'hydrolysat récupérée, en appliquant d'autres procédés qu'une simple filtration.
La diminution du ratio L/B permet donc bien de concentrer les hydrolysats mais les saccharides extraits et disponibles pour la fermentation diminuent, ce qui pourrait remettre en cause la rentabilité du procédé

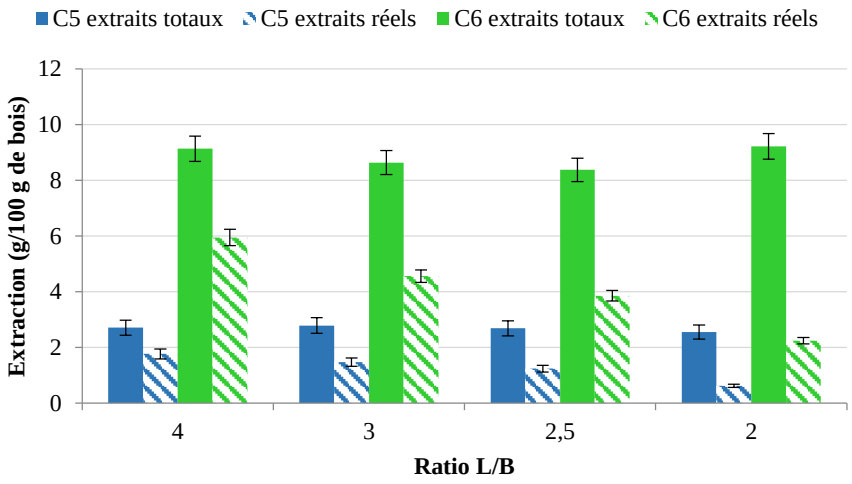


Figure 66 : Pentoses et hexoses extraits au total (barres pleines) et effectivement obtenus dans la liqueur récupérée (barres hachurées), selon le ratio L/B

4 Recyclage des hydrolysats

Le recyclage des hydrolysats, en mode discontinu, est un procédé qui consiste à utiliser un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse comme liqueur pour effectuer une nouvelle hydrolyse dans l'objectif d'enrichir l'hydrolysat en sucres. Le procédé peut être répété autant de fois que voulu (Figure 67).

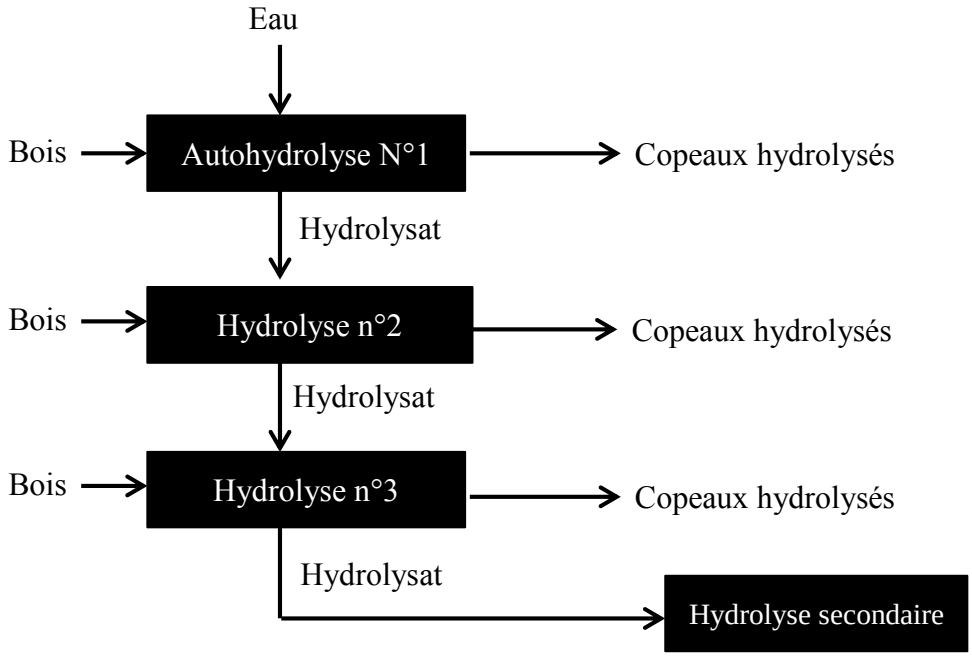


Figure 67 : Schéma du recyclage d'un hydrolysat (une autohydrolyse suivie de deux recyclages)

4.1 Recyclage des hydrolysats en utilisant un ratio L/B de 4

Le procédé de recyclage a été appliqué deux fois (une autohydrolyse suivie de deux recyclages) à un ratio L/B de 4. Les conditions d'hydrolyses sont celles de l'autohydrolyse 170 utilisée lors de la partie B.1 de ce chapitre (température : 170°C, durée de montée en température : 30 min, durée à température : 65 min, durée de descente en température : 10 min).

La composition des hydrolysats obtenus au fur et à mesure des recyclages est donnée sur la Figure 68. Comme attendu, le recyclage permet bien de concentrer les hydrolysats en saccharides. Néanmoins, les gains en hexoses sont relativement faibles et ceux en pentoses peu significatifs. En faisant l'hypothèse que la quantité de saccharides extraite est identique pendant l'autohydrolyse et les recyclages, 17,6 g/l de pentoses et 59,2 g/L d'hexoses devraient être obtenus après les deux recyclages. Or ces concentrations ne sont que de 9,5 ± 0,6 g/L et 45,5 ± 1,8 g/L. Une dégradation plus importante est en effet observée, traduite par une augmentation conséquente des teneurs en HMF et furfural. Ce comportement avait déjà été observé lors de rares essais de ce type [53]. Cette constatation est plus visible sur la Figure 69, qui montre que la proportion en inhibiteurs augmente par rapport à la teneur en hexoses. Pour 100 g d'hexoses, les concentrations en HMF et furfural augmentent fortement quand un hydrolysat est recyclé. Cette sur-dégradation n'est pas due à un changement de conditions d'extraction, le pH de la liqueur, notamment, reste identique malgré les recyclages et l'augmentation des concentrations en acides. Ceci explique également que la quantité de matière extraite est également stable : 25% de matière sèche est extraite du bois à chaque hydrolyse. L'augmentation des concentrations en HMF et furfural provient en fait principalement de la dégradation des monomères solubilisés présents en début de recyclage dans la liqueur. Ce constat est appuyé par l'accroissement des taux de monomères au cours des recyclages (Figure 70). Chaque liqueur contient une plus grande quantité de monomères susceptibles d'être dégradés en début d'extraction.

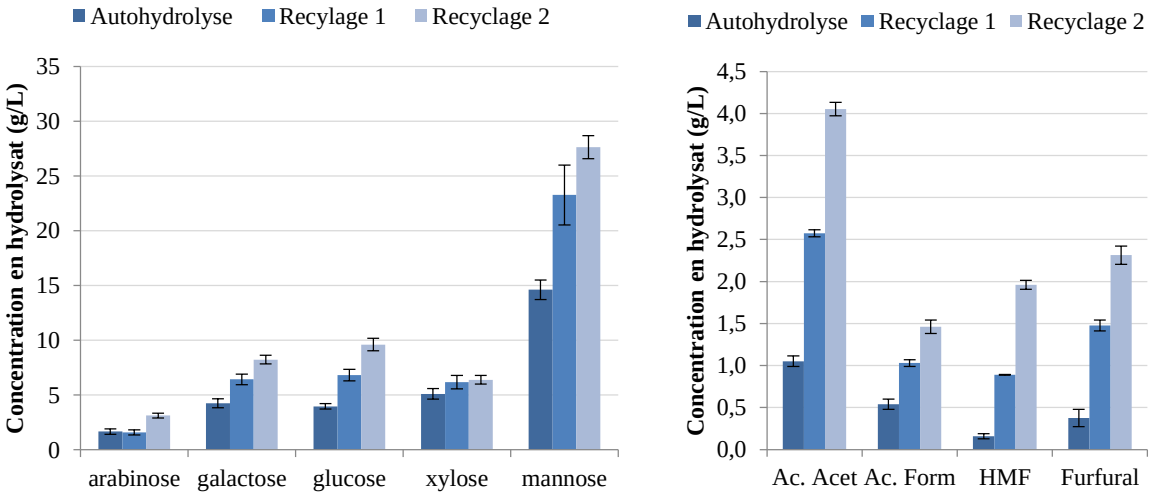


Figure 68 : Concentrations en saccharides (monomères et oligomères cumulés, figure de gauche), acide acétique, acide formique, HMF et furfural (figure de droite) mesurées au cours des recyclages effectués à un ratio L/B de 4

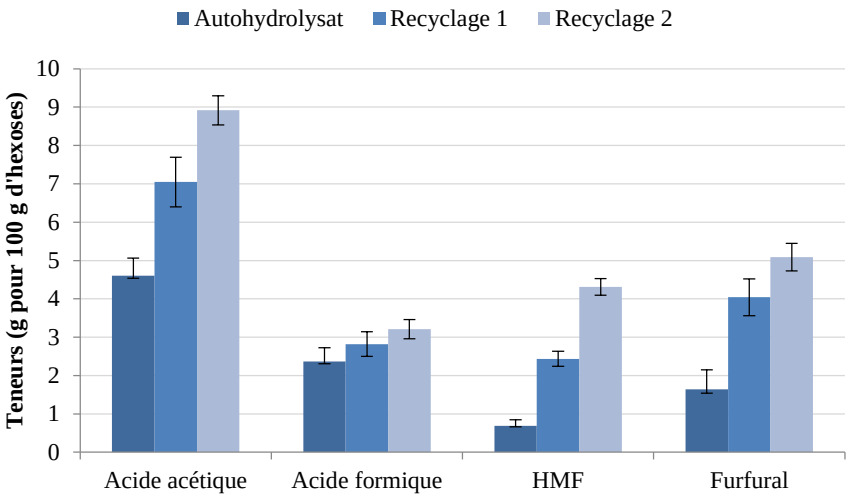


Figure 69 : Teneurs en acide acétique, acide formique, HMF et furfural dans les hydrolysats en grammes pour 100 g d'hexoses

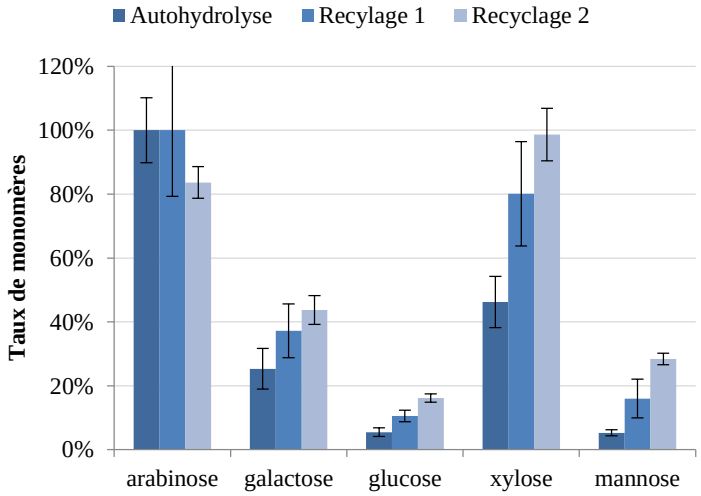


Figure 70 : Evolution des taux de monomères pour chaque saccharide au fur et à mesure des recyclages

4.2 Optimisation pour atteindre 60 g/L d'hexoses

Suite aux essais précédents, un petit modèle a été mis au point, permettant de déterminer le ratio L/B et/ou le nombre de recyclages à effectuer pour atteindre une concentration cible en hexoses (Equations 18 et 19).

Equation 18

$$C_i = (C_{i-1} + C_0 \times f_{dilution}) \times (1 - f_{dégradation})$$

Avec C_i : concentration en C6 au $i^{ème}$ recyclage ; C_0 : concentration en C6 après la première autohydrolyse ; $f_{dégradation}$: facteur empirique définissant le pourcentage d'hexoses dégradés ; $f_{dilution}$: facteur de dilution de la liqueur avec l'eau contenue dans les copeaux

Equation 19

$$f_{dilution} = \frac{\frac{L}{B} - (\frac{1}{S} - 1)}{\frac{L}{B}}$$

L/B : ratio L/B ; S : siccité des copeaux

Ce modèle a été utilisé pour déterminer le ratio L/B nécessaire pour obtenir 60 g/L d'hexoses après un seul recyclage, afin de limiter la dégradation. Le facteur de dégradation ($f_{dégradation}$) utilisé a été fixé à 15%, d'après les essais précédents. Un ratio L/B d'environ 2 doit alors être utilisé.

Une autohydrolyse suivie d'un unique recyclage à des ratios L/B de 2 ont donc été effectués. La concentration finale en hexose atteint 60,1 ± 5,6 g/L, ce qui valide le modèle (Figure 71). De plus, cet essai conduit aux mêmes conclusions que précédemment. La concentration en hexoses augmente alors que les teneurs en pentoses stagnent, leur extraction étant majoritairement compensée par leur dégradation. De même, les taux de monomères (Figure72) et les quantités de HMF et de furfural augmentent après le recyclage (Figure 73). La quantité de HMF et furfural pour 100 g d'hexoses est cependant beaucoup plus faible après un recyclage à un ratio L/B de 2 qu'après deux recyclages à un ratio L/B de 4. Ainsi, ces chiffres sont de 1,7 ± 0,4 et 2,5 ± 0,4 g pour 100 g d'hexoses pour le HMF et le furfural dans le premier cas, et de 4,3 ± 0,2 et 5,1 ± 0,4 g pour 100 g d'hexoses dans le second.

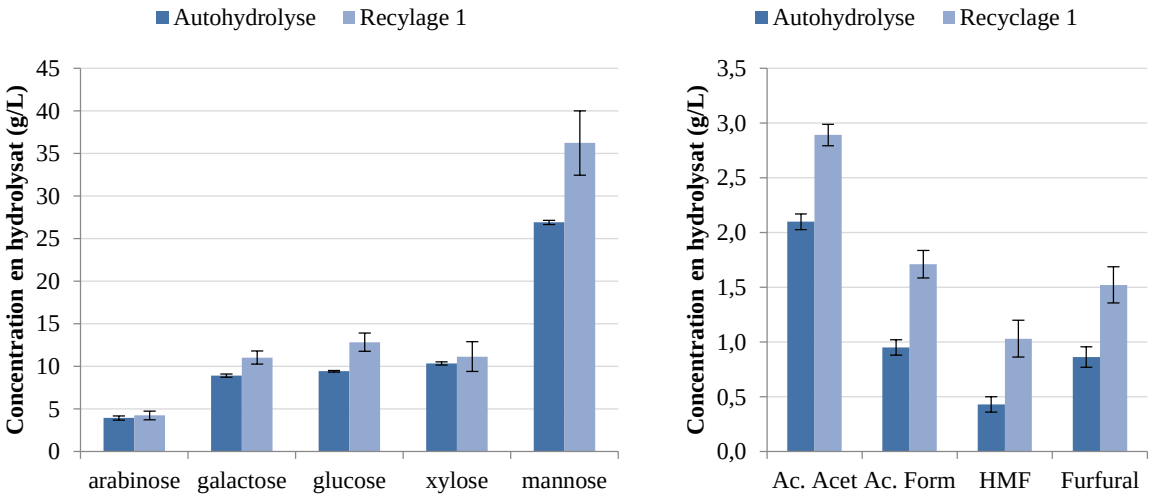


Figure 71 : Concentrations en saccharides (monomères et oligomères cumulés, figure de gauche), acide acétique, acide formique, HMF et furfural (figure de droite) mesurées au cours de l'autohydrolyse et du recyclage effectués à un ratio L/B=2

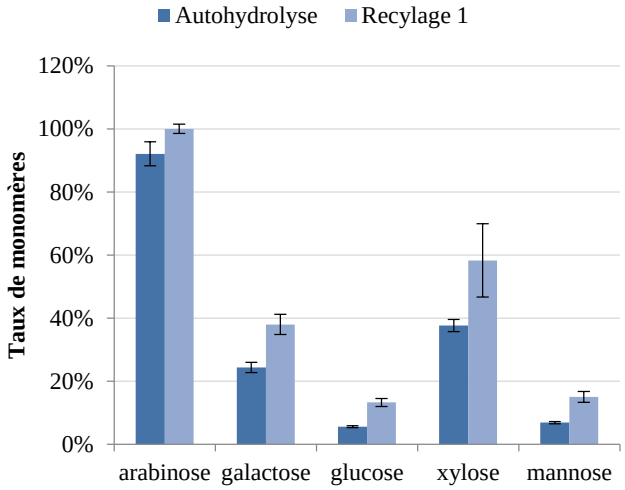


Figure 72 : Evolution des taux de monomères pour chaque saccharide au cours de l'autohydrolyse et du recyclage effectués à un ratio L/B=2

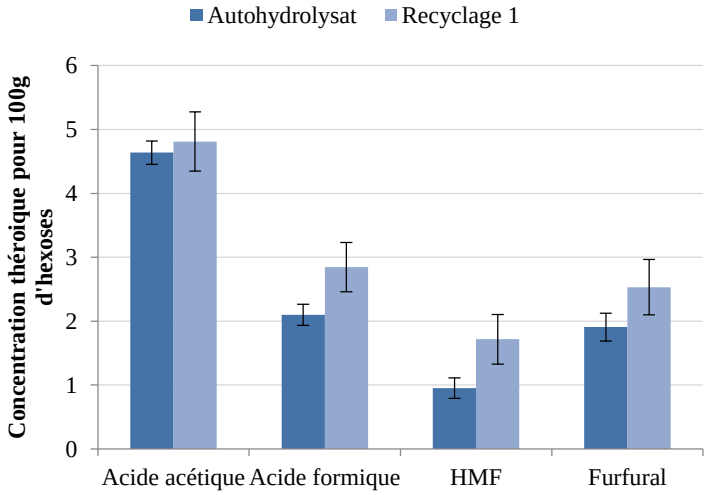


Figure 73 : Teneurs en acide acétique, acide formique, HMF et furfural dans les hydrolysats en grammes pour 100 g d'hexoses

Le recyclage permet d'augmenter drastiquement les concentrations des hydrolysats en saccharides, ainsi qu'en inhibiteurs. Cependant il ne peut pas être directement transposé à une production industrielle. En effet, lors de ces essais, l'hydrolysat d'une extraction compose la totalité de la liqueur ajoutée pour l'extraction suivante. Or, une extraction de 100 g de bois nécessite toujours plus de liqueur qu'elle ne donne d'hydrolysat. A une siccité de copeaux de 55%, l'extraction requiert l'ajout de 318 mL de liqueur, et donne 260 mL d'hydrolysat. Pour mettre au point un procédé viable, il faudrait compenser le manque de liqueur par de l'eau, ce qui fait l'objet de la partie suivante.

4.3 Recyclage à quantité de bois constante

Ces essais ont été réalisés à un ratio L/B de 4, toujours avec les mêmes paramètres d'hydrolyse. Concernant le recyclage, pour 100 g de copeaux extraits, la liqueur était donc composée des

260 mL d'hydrolysat obtenues de la précédente autohydrolyse et de 58 mL d'eau, les 82 mL restants constituant l'eau entrant dans la composition des copeaux.
Les concentrations en saccharides obtenues diminuent logiquement par rapport à l'essai précédent. La concentration finale en hexoses, qui était de 36,1 ± 3,7 g/L sans dilution, passe à 31,7 ± 3,2 g/L (Figure 74).

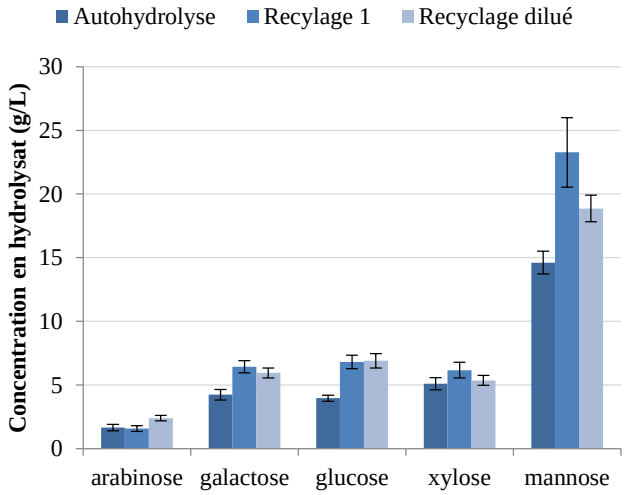


Figure 74 : Concentrations en saccharides (monomères et oligomères cumulés), mesurées après une autohydrolyse, après un recyclage sans dilution de la liqueur (recyclage 1), et avec un recyclage avec dilution

Comme précédemment, un modèle a été mis au point pour déterminer les concentrations en hexoses atteintes en fonction du ratio L/B et du nombre de recyclage. L'équation de base reste la même (Equation 18), seul le facteur de dilution change.

Equation 20

$$f_{dilution} = \frac{\frac{L}{B} - (\frac{1}{S_f} - 1) \times \eta}{\frac{L}{B}}$$

S_f : siccité des copeaux à la fin de l'extraction (35%) ; η : rendement d'extraction (g de copeaux obtenus pour 100 g de copeaux initial) ; L/B : ratio L/B

Ce modèle permet d'anticiper les résultats des recyclages. Ces calculs démontrent notamment qu'utiliser un faible ratio L/B est d'autant plus contraignant. La dilution de la liqueur à effectuer avant chaque hydrolyse pour traiter une même quantité de bois s'accroit quand le ratio L/B décroit. Il est inévitable de la diluer par 2 avec un ratio L/B de 2, pour seulement une dilution par 1,7 avec un ratio L/B de 4. La Figure 75 montre ainsi que les deux courbes « avec dilution » convergent, le gain en concentration dû au ratio L/B diminue donc au fur et à mesure des recyclages. *A contrario*, les courbes « sans dilution », divergent.

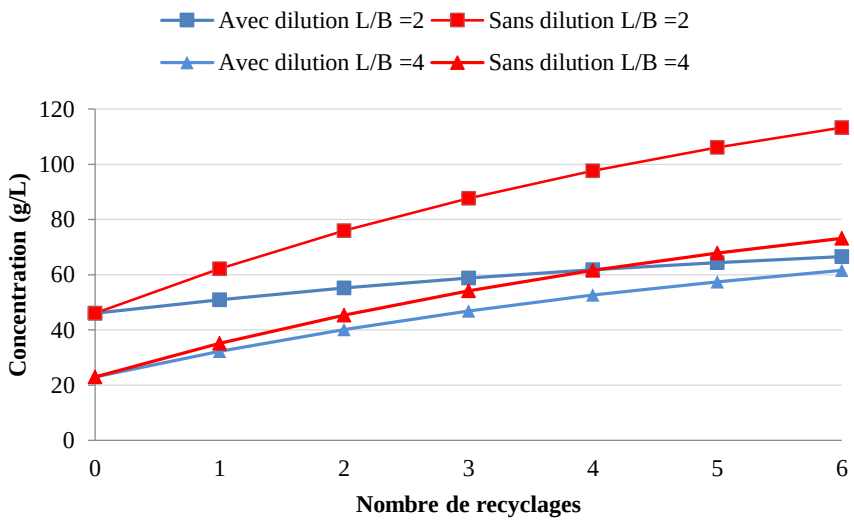


Figure 75 : Concentrations théoriques obtenues au cours des recyclages, selon le ratio L/B, avec (bleu) ou sans (rouge) dilution de la liqueur avant l'extraction

Pour conclure sur ce procédé, le recyclage d'un hydrolysat permet bien de le concentrer en hexoses. Cependant, les concentrations en HMF et furfural augmentent plus rapidement que les concentrations en hexoses, du fait de la dégradation des mono et oligosaccharides solubilisés durant les extractions précédentes. Associer le recyclage à un ratio L/B plus bas pourrait paraître une bonne idée car cela limite le nombre de boucles de recyclage, et donc la dégradation des saccharides. Néanmoins, le gain obtenu est limité par l'indispensable dilution de la liqueur ainsi que par la quantité plus faible de saccharides extraite et disponible pour la fermentation.

Dans cette partie, le recyclage a été effectué en procédé discontinu, l'équivalent en mode continu consisterait en un recyclage d'une partie de l'hydrolysat vers le réacteur d'extraction (Figure 76, voir aussi [172]). Dans ce cas, le paramètre permettant de réguler la concentration en saccharides n'est plus le nombre de recyclages mais le débit d'hydrolysat renvoyé en début d'extraction.

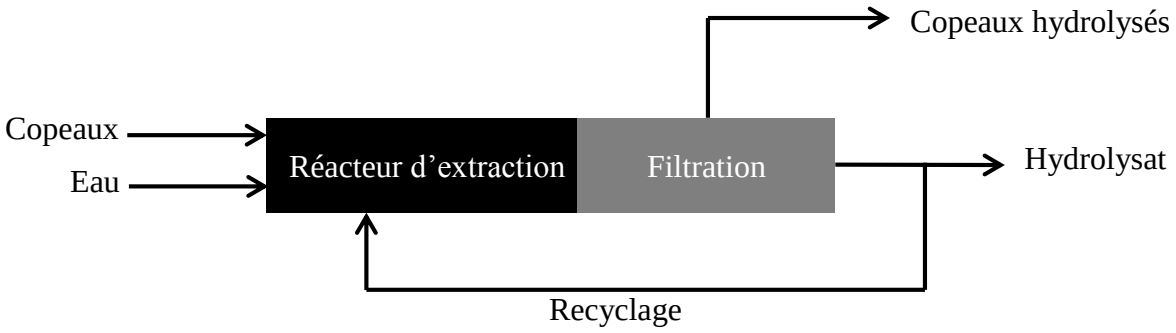


Figure 76 : Procédé de recyclage en mode continu

5 Conclusion

Pour conclure sur cette partie, l'augmentation de la concentration en saccharides peut être effectuée pendant l'extraction, en diminuant le ratio L/B et en recyclant l'hydrolysat dans la liqueur d'extraction. Ces procédés ont cependant chacun un inconvénient. Diminuer le ratio L/B réduit la quantité de saccharides effectivement extraite des copeaux, alors que le recyclage entraine une dégradation des saccharides présents dans la liqueur recyclée. Après l'extraction, l'hydrolysat peut être concentré par évaporation, que ce soit une évaporation flash en sortie d'extraction, ou une évaporation plus poussée. Cela permet en outre d'extraire une partie des inhibiteurs à la fermentation, même si l'hydrolysat obtenu en contiendra globalement plus en terme de concentration. D'autres procédés alternatifs existent, comme la nanofiltration. La membrane permet alors de retenir les hémicelluloses, surtout les oligomères, et de laisser passer les molécules d'eau, permettant de concentrer l'hydrolysat [39], [71].

E. Résumé du chapitre

Différents types de traitement du bois pour en extraire les hémicelluloses ont été comparés. Les traitements alcalins permettent de préserver les fibres et la cellulose. Cependant, ils ne sont pas efficaces au regard des quantités de saccharides extraites. L'hydrolyse acide a permis d'obtenir une concentration en hexoses de 33,9 g/L, en extrayant 86% des GGM, dont 89% sous forme monomère. Cela permettrait de produire environ 3,6 g d'éthanol pour 100 g de bois. Cependant, le traitement acide est relativement sévère et entraine une dégradation non négligeable des saccharides et de la cellulose. Un traitement en deux étapes autohydrolyse-hydrolyse acide a été optimisé pour réduire ces deux inconvénients. Alors que l'utilisation d'enzymes ne s'est pas révélée très efficaces sur les hexoses, l'hydrolyse secondaire catalysée par de l'acide sulfurique à température modérée favorise la dépolymérisation des oligomères tout en réduisant drastiquement la dégradation des saccharides. La quantité d'hexoses obtenue est néanmoins plus faible comparée à l'hydrolyse acide, avec une concentration de 23,0 g/L et une extraction de 55 à 58% des GGM présents initialement dans le bois. Par ailleurs, dans le cas de l'autohydrolyse comme dans le cas de l'hydrolyse acide, seuls environ 65% de la matière extraire est réellement récupérée si un simple égouttage est effectué pour séparer l'hydrolysat des copeaux. Cela représenterait une production en éthanol de l'ordre de 2,5 g pour 100 g de bois. La récupération d'une plus grande quantité de saccharides pourrait permettre d'augmenter considérablement la production d'éthanol. Par ailleurs, trois procédés ont été étudiés pour augmenter la teneur en saccharides des hydrolysats : l'évaporation, diminuer le ratio L/B et recycler l'hydrolysat en le réutilisant lors de plusieurs hydrolyses. En déterminant le bon compromis entre ces procédés, il devrait être possible d'atteindre une concentration suffisante en saccharides tout en limitant les effets négatifs. Il reste maintenant à évaluer la possibilité de fermenter ces hydrolysats, notamment après leur concentration

Chapitre III : Fermentations

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la possibilité de fermenter des hydrolysats obtenus après une hydrolyse acide ou une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire. Cela représente donc différentes concentrations en sucres et inhibiteurs. L'effet de chaque type d'inhibiteur sera ensuite étudié. Dans une troisième partie, l'adaptation de différentes souches de *S. cerevisiae* sera examinée.

A. Fermentations directes d'hydrolysats

Différents hydrolysats ont été fermentés directement après leur production. Pour ces fermentations, une souche sauvage de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie pour ses indéniables qualités (cf. chapitre I partie C.2.1). Ces essais permettront d'évaluer les limites de cet organisme. Les seules modifications apportées aux hydrolysats sont l'ajout d'une source de nutriments (azote) et une correction du pH à 4,5. Une souche de levure *S. cerevisiae,* fournie par Sigma Aldrich, a été utilisée à une concentration de 10 g/L.

Les hydrolysats fermentés sont :

- Un autohydrolysat ayant subie une hydrolyse secondaire
- Trois hydrolysats d'hydrolyse acide effectuées avec 1% d'acide sulfurique par rapport au bois (il s'agit d'un même hydrolysat dilué selon trois facteurs de dilution différents, voir les concentrations initiales dans le Tableau 33)
- Un hydrolysat d'hydrolyse acide effectuée avec 3% d'acide sulfurique par rapport au bois
- Un autohydrolysat concentré, puis ayant subi une hydrolyse secondaire
- Un hydrolysat concentré obtenu après une hydrolyse acide effectuée avec 1% d'acide sulfurique par rapport au bois

L'hydrolyse acide 3% a été effectuée dans le seul but de produire volontairement des inhibiteurs. Elle a été menée dans les mêmes conditions que l'hydrolyse acide 1% déjà étudiée (cf. chapitre II partie B.1). Il est du reste vraisemblable que des inhibiteurs autres que ceux mesurés y soient présents, comme des composés phénoliques.
Les étapes de concentration des hydrolysats ont été réalisées par évaporation de l'eau sous vide (cf. chapitre II partie D.2). Cette évaporation a entrainé la perte, dans les vapeurs, d'une partie de l'acide acétique et de la majorité du furfural. Les concentrations initiales des hydrolysats sont données dans les Tableaux 33 et 34. Les différentes fermentations sont notamment intéressantes par leurs différentes teneurs en inhibiteurs de fermentation.

	Autohydrolyse + 2nd hydrolyse	Hydrolyse acide 1% (1)	Hydrolyse acide 1% (2)	Hydrolyse acide 1%(3)	Hydrolyse acide 3%
Arabinose	1,89 ± 0,10	0,95 ± 0,09	2,31 ± 0,22	1,60 ± 0,15	1,13 ± 0,11
Galactose	2,32 ± 0,12	1,92 ± 0,28	3,24 ± 0,48	3,85 ± 0,57	1,52 ± 0,22
Glucose	7,67 ± 0,38	3,40 ± 0,58	5,01 ± 0,85	7,24 ± 1,22	8,69 ± 1,47
Xylose	3,87 ± 0,19	2,63 ± 0,19	5,16 ± 0,37	6,73 ± 0,48	1,06 ± 0,07
Mannose	9,38 ± 0,47	5,35 ± 0,65	9,05 ± 1,09	11,46 ± 1,38	2,57 ± 0,31
Somme hexoses	19,36 ± 0,97	10,66 ± 1,50	17,30 ± 2,42	22,55 ± 3,17	12,78 ± 2,00
Acide acétique	1,35 ± 0,07	1,49 ± 0,1	2,15 ± 0,14	3,05 ± 0,21	3,17 ± 0,21
HMF	0,10 ± 0,04	1,00 ± 0,23	1,33 ± 0,31	1,88 ± 0,44	4,43 ± 1,03
Furfural	0,26 ± 0,02	0,81 ± 0,23	0,69 ± 0,19	1,10 ± 0,31	2,38 ± 0,67
Acide formique	0,70 ± 0,03	1,08 ± 0,07	1,77 ± 0,11	2,31 ± 0,14	1,99 ± 0,12
Acide lévulinique	0,38 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,54 ± 0,05	1,58 ± 0,16

Tableau 33 : Concentrations initiales (g/L) en saccharides et espèces inhibitrices dans les hydrolysats

	Autohydrolyse concentrée	Hydrolyse acide concentrée (1%)
Arabinose	6,26 ± 0,60	5,90 ± 0,57
Galactose	7,80 ± 1,15	9,06 ± 1,34
Glucose	11,00 ± 1,86	18,28 ± 3,09
Xylose	9,98 ± 0,71	13,25 ± 0,94
Mannose	28,91 ± 3,49	38,48 ± 4,64
Somme hexoses	47,71 ± 6,50	65,82 ± 9,07
Acide acétique	5,17 ± 0,35	5,46 ± 0,37
HMF	0,19 ± 0,04	4,63 ± 1,08
Furfural	0,02 ± 0,00	n.d.
Acide formique	1,39 ± 0,09	2,22 ± 0,14
Acide lévulinique	0,55 ± 0,05	1,29 ± 0,13

Tableau 34 : Concentrations initiales (g/L) en saccharides et espèces inhibitrices dans les hydrolysats concentrés (n.d. non détectable)

1 Rendements de fermentation

Pour ces premières expériences, l'objectif était d'obtenir de bons rendements de fermentation après 24 heures. Deux types de rendements ont été calculés. Le rendement de fermentation global, en fonction des sucres fermentescibles présents initialement dans le milieu de fermentation, et le rendement calculé sur les sucres consommés pendant la fermentation. Ces rendements, appelés rendements de Gay-Lussac, sont calculés à partir de la production théorique maximum en éthanol (51,1 g d'éthanol pour 100 g d'hexoses), sachant que ce maximum ne peut pas être atteint. En pratique, le maximum représente 94,7% du rendement théorique d'après Louis Pasteur (cf. chapitre I, C.2.1). Les rendements représentent donc le pourcentage d'hexoses effectivement transformé en éthanol.

Concernant les fermentations non concentrées, les rendements sont donnés sur la Figure 77. Certains rendements dépassent le maximum possible. Cet écart est dû aux erreurs induites par

les mesures et représentées par les barres d'erreur. Les fermentations des hydrolysats résultant de l'autohydrolyse et des hydrolyses acides à 1% donnent de bons résultats. Les sucres fermentescibles ne sont toutefois pas totalement consommés, d'où l'écart entre le rendement global et le calcul sur les sucres consommés. Pour l'autohydrolyse, 84% du glucose est consommé, alors que le mannose l'est entièrement. Pour l'hydrolyse acide 1% (1), le glucose et le mannose sont consommés à 86% et 99% respectivement. Concernant, les hydrolyses acides 1% (2) et (3), ces deux sucres sont consommés à 99%, seules quelques traces subsistent dans le milieu de fermentation. Cependant, le galactose n'est pas utilisé pour ces quatre fermentations. Ce n'est pas surprenant car il est connu que *S. cerevisiae* ne le consomme qu'à défaut de glucose ou de mannose (cf. chapitre I, partie C.2.1).
Pour ces fermentations, la production de glycérol, le coproduit le plus abondant après l'éthanol, se situe entre 2,3 et 3,2 g pour 100 g d'hexoses consommés. Cette valeur est légèrement inférieure à ce qui a déjà été observé, ce qui peut expliquer les excellents rendements observés sur les hexoses consommés [153]. Ces bons résultats ne sont pas si surprenants. Les usines de pâte au bisulfite produisent habituellement de l'éthanol en fermentant leurs liqueurs contenant furfural, HMF, acide acétique, acide formique et acide lévulinique (cf. chapitre I, partie B.2.2).

L'hydrolysat résultant d'une hydrolyse acide 3% n'a pas pu être fermenté. Une faible quantité d'éthanol a certes été mesurée, mais le rendement est très faible. Les quantités d'inhibiteurs sont trop importantes. Le rendement sur les sucres consommés est également relativement faible. Une partie des hexoses aurait été consommée, sans toutefois produire de l'éthanol mais sans doute d'autres sous-produits.

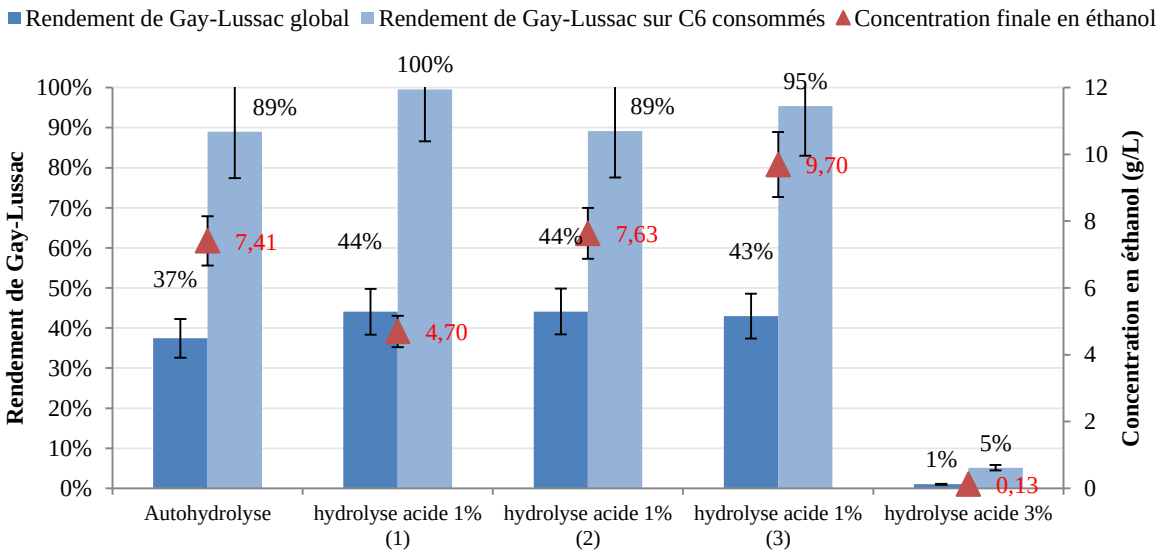


Figure 77 : Rendements de Gay-Lussac et concentrations finales en éthanol après 24h pour les fermentations directes non concentrées

Les fermentations faites à partir d'un hydrolysat résultant d'une hydrolyse acide et d'un autohydrolysat concentrés ont également été non-productives. Aucune trace d'éthanol n'a été relevée, même après 48 heures. De plus, les concentrations en sucres sont restées stables pendant les fermentations.
Les mauvais résultats obtenus avec l'hydrolyse acide 3% et l'hydrolyse acide concentrée ne sont pas si surprenants. Une étude effectuée sur des hydrolysats similaires obtenus selon

différentes sévérités a démontré que les fermentations étaient fortement inhibées quand le facteur de sévérité combinée se rapproche de 3,5. Cela correspond à des concentrations en acide acétique, acide formique, acide lévulinique, HMF et furfural d'environ 5 g/L, 5 g/L, 1—6 g/L, 3—6 g/L, et 2 g/L respectivement [66]. Or les hydrolysats obtenus dans cette partie sont proches de ces gammes de concentrations. Le résultat est cependant plus surprenant concernant l'autohydrolysat concentré, qui contient peu d'inhibiteurs si ce n'est des concentrations en acide acétique et formique de 5,17 ± 0,35 et 1,39 ± 0,09 g/L.

2 Impact de la fermentation sur les inhibiteurs

L'évolution des concentrations en acide acétique, furfural et HMF lors des fermentations qui se sont révélées efficaces sont données sur la Figure 78. L'acide acétique est en légère augmentation. Il s'agit en effet d'un des coproduits de la fermentation éthanolique. La production de cet acide lors des fermentations qui ont donné de bons rendements ne dépasse pas 2,4 g pour 100g d'hexoses consommés, ce qui est dans l'ordre des choses [153].
Le HMF et le furfural sont métabolisés par les levures en alcool furfurylique et en 2,5-bis-hydroxymethylfurane. Le HMF est plus difficile à métaboliser (cf. chapitre I, partie C.2.2), ce qui se confirme avec ces mesures. Le furfural est quasiment entièrement consommé après 24h, alors que le HMF ne l'est que dans le cas de l'autohydrolyse. Dans les autres cas, sa consommation ne dépasse pas 45% de sa teneur initiale.

Ces essais préliminaires ont permis de démontrer qu'un hydrolysat acide et un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire peuvent être fermentés en 24 heures. Les concentrations en inhibiteurs ne sont pas suffisamment élevées pour être réellement problématiques. Cependant, si, comme il semble indispensable, l'hydrolysat à fermenter doit être plus concentré, les inhibiteurs deviennent problématiques. Il serait alors peut-être indispensable de les éliminer. Il existe plusieurs moyens de détoxifications, dont l'efficacité est variable selon les inhibiteurs en présence. (cf. chapitre 1 partie C.2.3). Il est donc indispensable de déterminer les espèces à retirer en priorité.

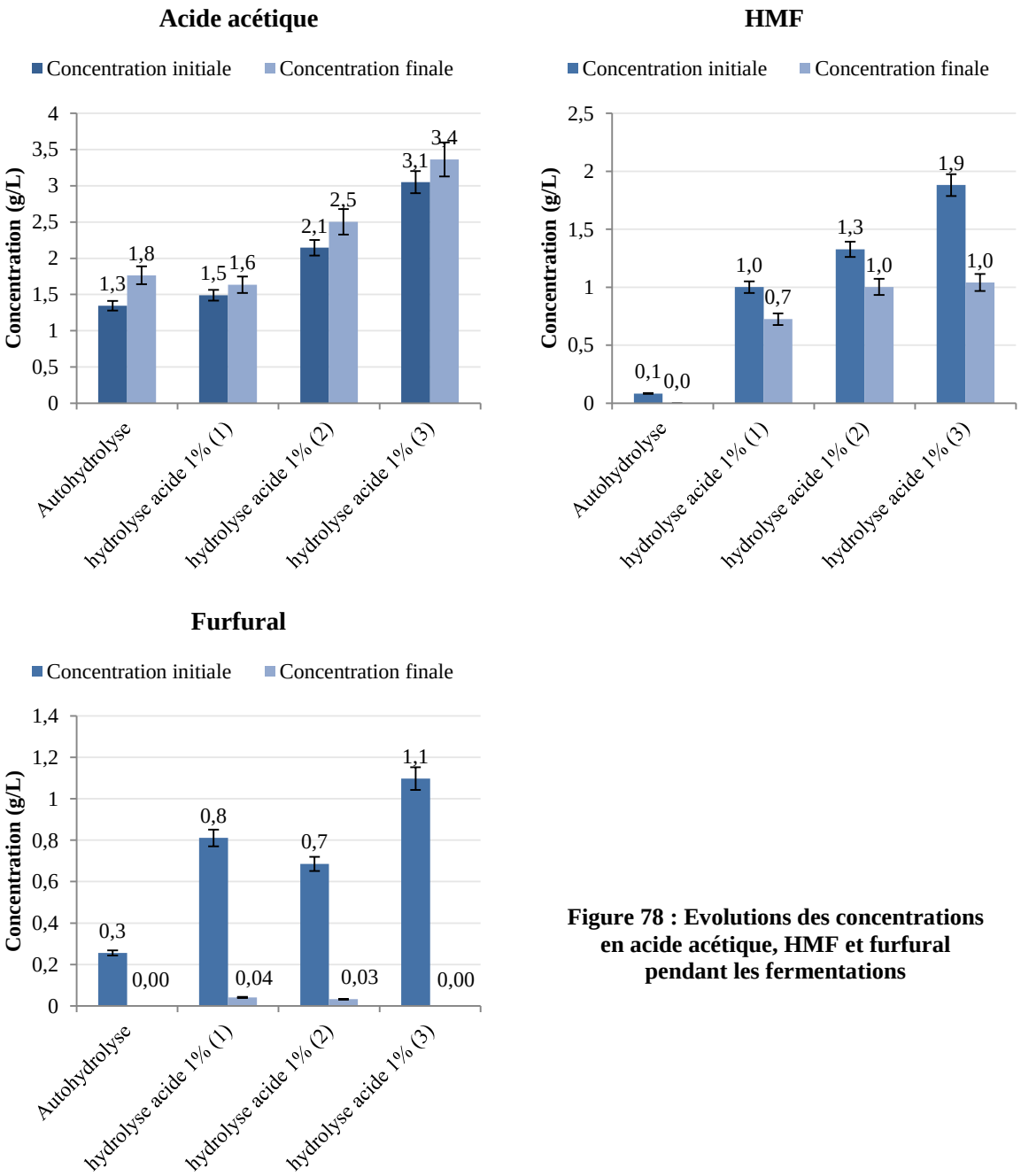


Figure 78 : Evolutions des concentrations en acide acétique, HMF et furfural pendant les fermentations

B. Impact des inhibiteurs sur la fermentation

L'impact des principaux inhibiteurs a été évalué sur des milieux synthétiques contenant les cinq sucres présents dans les hydrolysats obtenus précédemment. L'effet de chaque inhibiteur a tout d'abord été mesuré individuellement. Les concentrations utilisées, pour les sucres et les inhibiteurs, sont de l'ordre de celles qui seraient obtenues dans un autohydrolysat dépolymérisé et concentré à 100 g/L (rappelées dans le Tableau 35). Il a été considéré qu'aucune perte en inhibiteur n'avait lieu pendant l'étape de concentration, pour se mettre dans le cas le plus

défavorable. Les effets de concentrations intermédiaires, voire supérieures, ont aussi été évalués. Toutes les fermentations ont été menées à un pH proche de 4,5. Le pH peut avoir un effet non négligeable sur la fermentation, notamment dans le cas des acides organiques. Les résultats des fermentations ont été analysés après 4h, 24h et 48h. Les mesures après 4h permettent d'avoir une idée de l'effet des inhibiteurs sur la phase de latence. Les fermentations ont été poursuivies jusqu'à 48h si la totalité des hexoses n'était pas consommée après 24h. Les inhibiteurs étudiés sont les suivants :

- Furanes :
  - HMF
  - Furfural
- Extraits du bois
- Dérivés de lignine
- Acides organiques
  - Acide acétique
  - Acide formique
  - Acide lévulinique

Les extraits du bois utilisés ont été obtenus par extraction à l'acétone d'échantillons du bois utilisés dans cette étude. Il est difficile d'évaluer la quantité d'extractibles extraite pendant la pré-hydrolyse. Une concentration située aux alentours de 3 g/L a été utilisée. Les dérivés de lignine utilisés ici sont des lignosulfonates, obtenus après une cuisson au sulfite. Les effets inhibiteurs des sucres et de l'éthanol n'ont pas été étudiés, car *S. cerevisiae* est très tolérante et peu supporter des concentrations bien plus élevées que celles obtenues dans les hydrolysats, même concentrés (cf. chapitre I, partie C.2.1).

	Concentration (g/L)
HMF	2,2 ± 0,5
Furfural	3,3 ± 0,5
Acide acétique	12,5 ± 2,1
Acide formique	2,7 ± 0,4
Acide lévulinique	2,8 ± 0,1
Lignine soluble	0,2—8,0

Tableau 35 : Concentrations en espèces inhibitrices dans un hydrolysat concentré à 100 g/L d'hexoses

Les fermentations témoin, menées avec des sucres seuls, donnent des rendements de Gay-Lussac de 62, 85 et 81% après 4, 24 et 48h. La totalité des hexoses est consommée durant les premières 24h de fermentation. La diminution du rendement entre 24 et 48 heures s'explique par la baisse de concentration en éthanol qui suit la fin de la fermentation (cf. chapitre 1 partie C.2.1). Il est d'ailleurs probable que le rendement maximum soit supérieur aux 85% mesurés à 24h.

La variation des mesures est très importante après 4h de fermentation (coefficient de variation de 36%) alors que les conditions sont similaires. Le coefficient de variation est ensuite de 9 et 10% à 24 et 48h, quand les fermentations sont terminées. Les résultats après 4h sont donc à prendre avec des réserves.

1 Effet des furanes, extraits du bois et lignosulfonates

1.1 4h de fermentation

Les rendements après 4h sont tous supérieurs à 30%, signe que la fermentation est possible dans tous les cas (Figure 79). La plupart des fermentations montre des rendements proches de ceux obtenus avec le témoin. Il est cependant difficile pour l'instant de tirer d'autres conclusions, tant les résultats divergent.

Le furfural est d'ores et déjà entièrement consommé, ce qui n'est pas le cas du HMF (Figure 80). Plus la concentration initiale en HMF est élevée, plus les levures sont « efficaces » pour le métaboliser. Ainsi, environ 40% du HMF disparaît pour les fermentations qui en contenaient moins de 2 g/L initialement. Ce chiffre monte à 60% à 6,36 g/L, puis 70% pour les deux fermentations qui en contiennent plus de 7,3 g/L. Aucun lien ne peut cependant être établi entre ces chiffres et le rendement de fermentation.

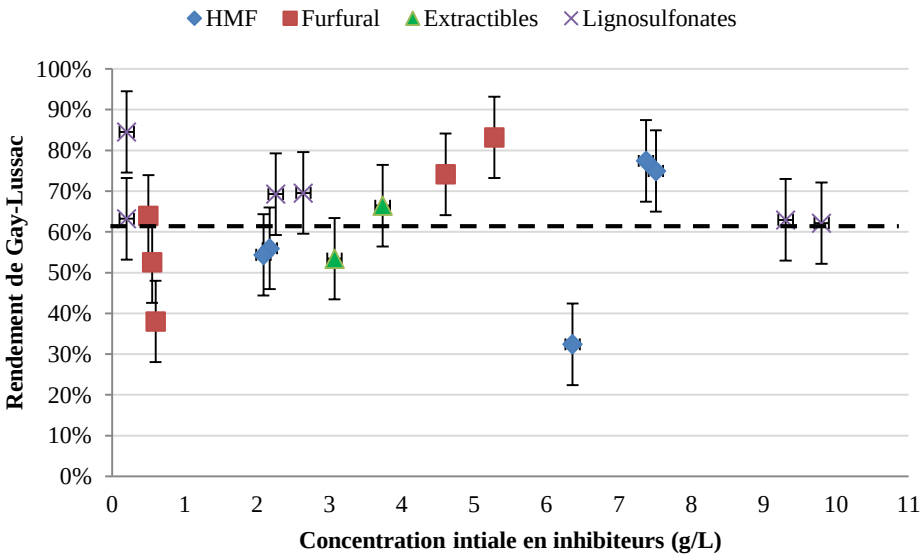


Figure 79 : Rendements de Gay-Lussac après 4h de fermentations en présence de HFM, de furfural, d'extraits de bois et de lignosulfonates, en fonction des concentrations initiales en inhibiteur. La ligne en pointillés représente le rendement de la fermentation témoin.

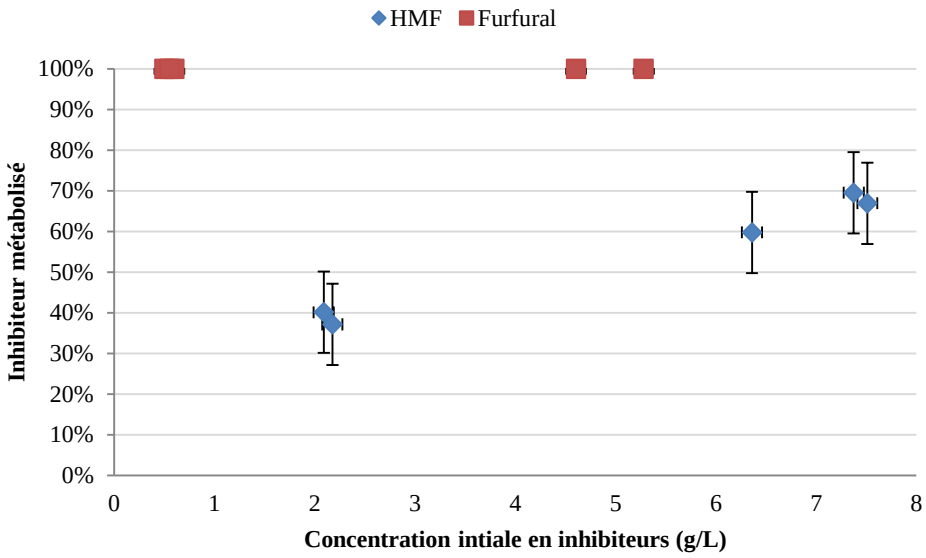


Figure 80 : Quantité de HMF ou de furfural métabolisé par les levures après 4h de fermentation

1.2 24 heures de fermentation

Après 24 heures de fermentation, les rendements des fermentations effectuées avec les furanes et les extractibles sont en général très bons (Figure 81). L'ensemble des hexoses a été consommé pour toutes ces fermentations excepté pour les deux fermentations qui contenaient le plus de furfural ainsi que les deux fermentations qui contenaient le plus de HMF (Figure 82). Pour celles-ci, plus de 85% des hexoses ont disparu, seule une partie du galactose reste (il représente 17 à 20% des sucres fermentescibles initialement). Ces fermentations sont sur le point de se terminer, alors que les autres ont déjà vu leurs concentrations en éthanol, et donc leurs rendements, diminuer. Ceci explique en partie les excellents rendements obtenus avec de fortes concentrations en HMF et furfural. De plus, il faut rappeler que le rendement maximum, en pratique, se situe autour de 92%. Les véritables rendements sont donc situés dans la fourchette inférieure des barres d'erreur.

Les milieux de fermentation testant le HMF contiennent encore de l'HMF, en concentrations très faibles.

Les fermentations impliquant les lignosulfonates sont moins efficaces pour des concentrations supérieures à 2 g/L. Pour celles-ci, le mannose et le glucose sont entièrement consommés, seul subsiste le galactose parmi les sucres fermentescibles. Néanmoins, les rendements de fermentation ne sont pas très élevés. En présence de lignosulfonates, les levures consomment bien les saccharides mais les consacrent principalement à d'autres utilisations que la production d'éthanol.

A la vue de ces résultats, il semblerait que le HMF, le furfural et les extractibles ne soient pas néfastes à la fermentation aux concentrations testées quand ils sont seuls. Les relativement faibles effets des furanes sur les hydrolysats avaient déjà été démontrés, mais pour des concentrations allant jusqu'à 4 g/L seulement [182]. De plus, les effets d'un panel relativement important de composés phénoliques ont été testés, montrant que la plupart d'entre eux avait une influence négligeable pour de faibles concentrations. Cependant, certains de ces composés pouvaient faire chuter les rendements à des concentrations supérieures à 1 g/L [135]. Pour rappel, les hydrolysats résultants d'une autohydrolyse contiennent environ 2 g/L de composés phénoliques mesurés par absorbance. En concentrant ces hydrolysats pour obtenir 100 g/L

d'hexoses, des concentrations en dérivés phénoliques de 6 à 7 g/L pourraient être obtenus, ce qui pourrait donc nuire fortement aux rendements de fermentation.

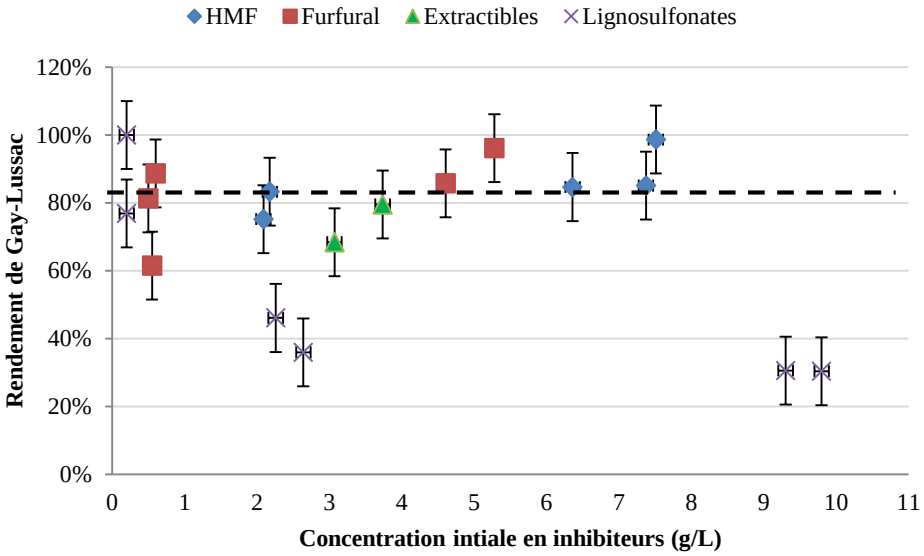


Figure 81 : Rendements de Gay-Lussac après 24h de fermentation en présence de HFM, de furfural, d'extraits de bois et de lignosulfonates, en fonction des concentrations initiales en inhibiteur. La ligne en pointillés représente le rendement de la fermentation témoin.

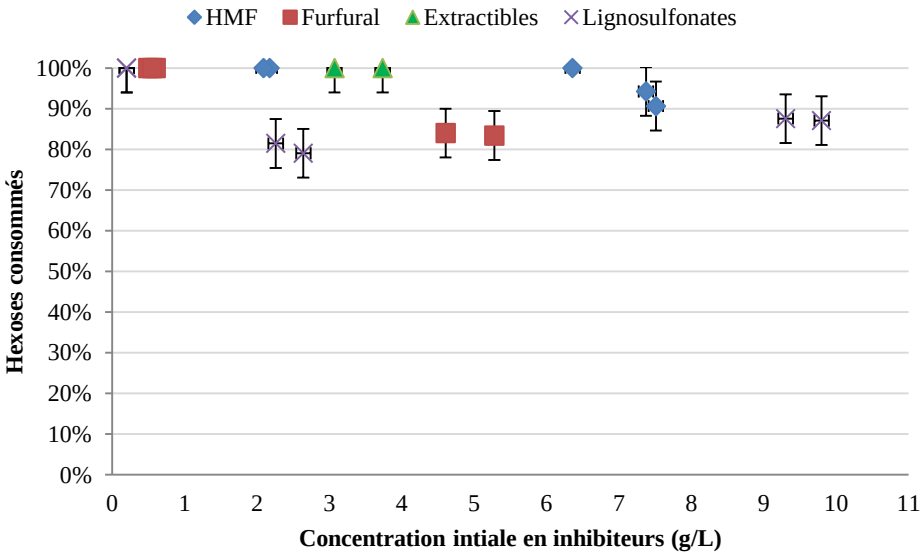


Figure 82 : Hexoses consommés après 24h de fermentation en présence de HFM, de furfural, d'extraits de bois et de lignosulfonates en fonction des concentrations initiales en inhibiteur

1.3 48 heures de fermentation

Après 48 heures de fermentation, les rendements ont peu évolué. Il est intéressant d'observer que le galactose n'a pas été assimilé par les levures pour les fermentations qui en contenaient encore après 24h (Figure 83). Les concentrations en galactose ont sensiblement diminué pour les fermentations avec HMF, mais pas pour celles contenant initialement du furfural et les lignosulfonates. Ce saccharide est en effet plus difficile à assimiler que le glucose ou le mannose, mais il semblerait même que dans certains cas, son assimilation devienne impossible.

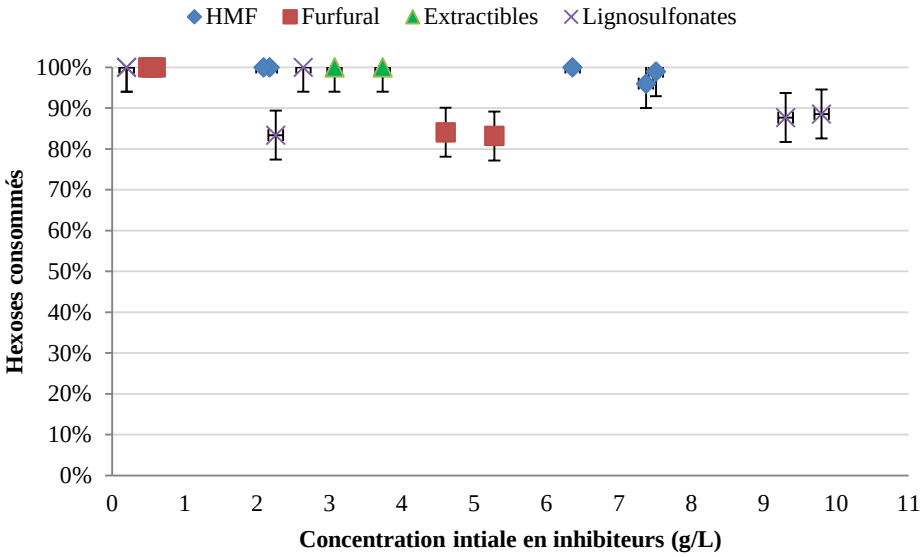


Figure 83 : Hexoses consommés après 48h de fermentation en présence de HFM, de furfural, d'extraits de bois et de lignosulfonates, en fonction des concentrations initiales en inhibiteur

2 Effet des acides organiques

2.1 4h de fermentation

Les rendements de Gay-Lussac après 4 heures de fermentation sont donnés sur la Figure 84. Seules les fermentations contenant de l'acide lévulinique et une fermentation avec de l'acide acétique produisent de l'éthanol en quantités significatives après 4h. Des rendements supérieurs aux rendements témoins peuvent être observés. La présence d'un acide organique en faible concentration peut en effet doper la production d'éthanol des levures (cf. chapitre I, partie C.2.2). Pour les autres fermentations, il semblerait que la phase de latence soit donc très longue pour les levures, qui ont besoin de s'habituer à cet environnement. Une autre possibilité est que la productivité volumétrique ($g_{éthanol}$/(L.h) de ces fermentations soit très faible.

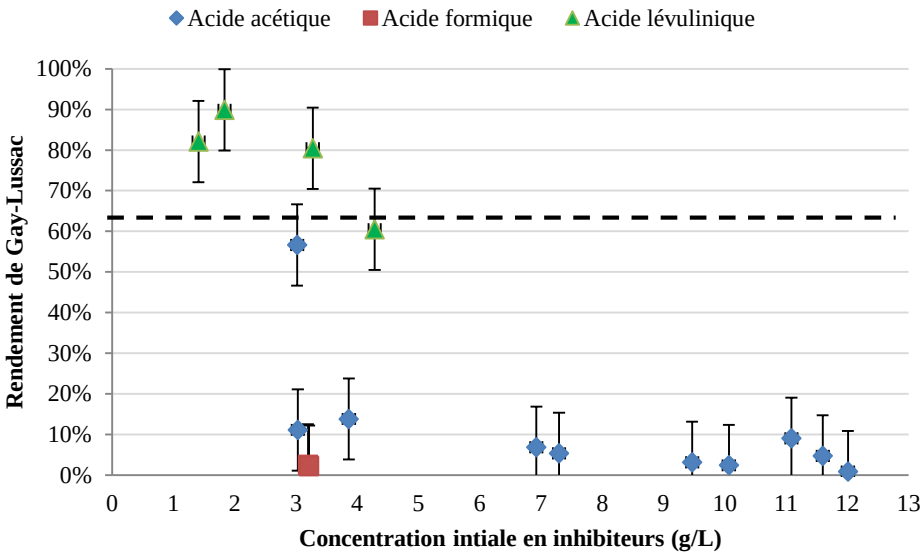


Figure 84 : Rendements de Gay-Lussac après 4h de fermentation en présence d'acide d'acétique, d'acide formique et d'acide lévulinique en fonction des concentrations initiales en inhibiteur. La ligne en pointillés représente le rendement de la fermentation témoin.

2.2 24h de fermentation

Après 24 heures de fermentation, la présence d'acide lévulinique seul, aux concentrations testées, n'affecte pas la fermentation de manière significative (Figure 85). L'ensemble du glucose et du mannose est métabolisé. Seule une partie du galactose subsiste. Ce résultat n'est pas surprenant, surtout à une concentration si faible, sachant que cet acide est reconnu, avec l'acide acétique, comme bien moins inhibiteur que l'acide formique (cf. chapitre 1, partie C.2.2), Ceci explique également que parmi les fermentations contenant 3 g/L d'acide, ce sont celles contenant de l'acide formique qui sont les moins avancées. Une concentration de seulement 3 g/L en acide formique a donc un impact non négligeable sur la fermentation.
L'effet de l'acide acétique a été testé à plusieurs concentrations, même si sa teneur dans les hydrolysats réels concentrés serait de l'ordre de 12 g/L. Tout comme pour l'acide lévulinique, le rendement de fermentation diminue progressivement à mesure que la teneur en acide augmente. Pour les deux fermentations qui en contiennent environ 3 g/L, la totalité des hexoses est consommée après 24h (Figure 86). Son effet d'inhibition est donc limité. Pour celle en contenant 3,99 g/L, une partie du galactose reste après 24h. Néanmoins, à partir de 7 g/L d'acide acétique, la fermentation devient très lente. Une étude avait observé l'existence d'un seuil, situé entre 6 et 7 g/L pour l'acide acétique et entre 4 et 5 g/L pour l'acide formique, à partir duquel la fermentation devenait très lente, voire totalement inhibée [182]. Cette étude était effectuée à un pH similaire à celui utilisé ici. Une autre publication, pour des fermentations réalisées à des pH de 5,5, observait bien une inhibition due aux acides, mais dans des proportions plus modestes [66]. Des rendements de 75% pouvaient être atteints avec une concentration de 15 g/L d'acide acétique. Les résultats de fermentation dépendent non seulement du pH, mais également de la souche de *S. cerevisiae* employée.

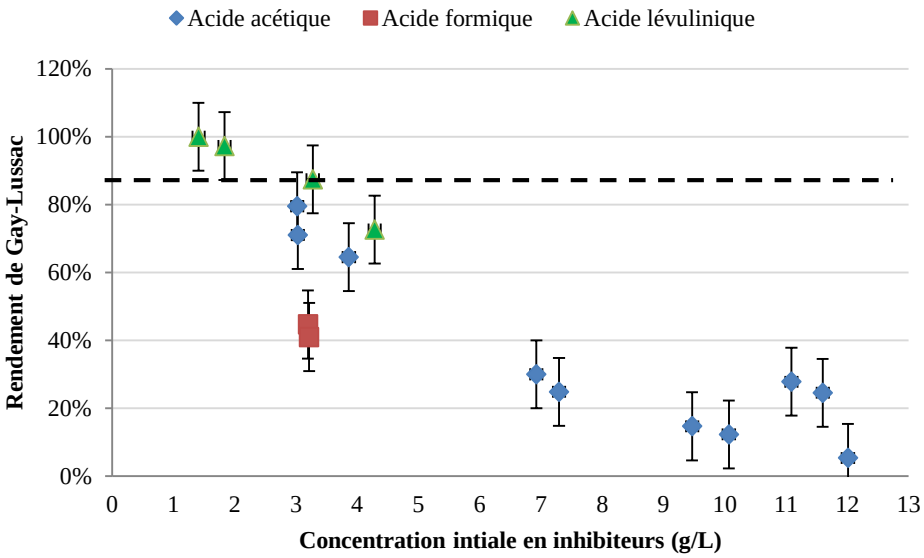


Figure 85 : Rendements de Gay-Lussac après 24h de fermentation en présence d'acide d'acétique, d'acide formique et d'acide lévulinique en fonction des concentrations initiales en inhibiteur

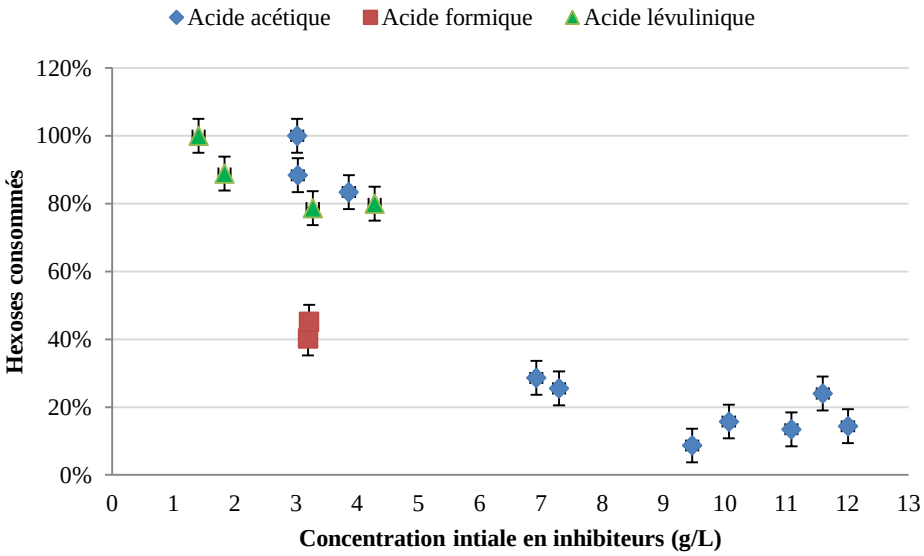


Figure 86 : Hexoses consommés après 24h de fermentation en présence d'acide d'acétique, d'acide formique et d'acide lévulinique en fonction des concentrations initiales en inhibiteur

2.3 48h de fermentation

Après 48h, les rendements des fermentations contenant de l'acide lévulinique n'ont pas progressé, les concentrations en galactose n'ont pas diminué significativement entre 24 et 48 heures de fermentation. Les rendements de fermentation avec l'acide formique seul sont devenus excellents après 48h : plus de 90% des hexoses ont été consommés et seule une partie du galactose étant encore présente dans les milieux de fermentation (Figures 87 et 88). Comme

il était possible de le supposer, l'inhibition a un impact sur la productivité volumétrique de la fermentation, mais pas sur le rendement final.
Les fermentations contenant de l'acide acétique ont également vu leurs rendements de Gay-Lussac globalement augmenter tant que la concentration en acide acétique est inférieure à 10 g/L. La consommation en hexoses est quasi-complète pour des concentrations en acide acétique en-dessous de 4 g/L. Au-delà, la productivité est très faible. De plus, pour des concentrations en acide acétique supérieures à 10 g/L, les rendements, ainsi que la quantité de sucres consommée, n'augmentent pas entre 24 et 48h. La fermentation semble donc totalement inhibée.

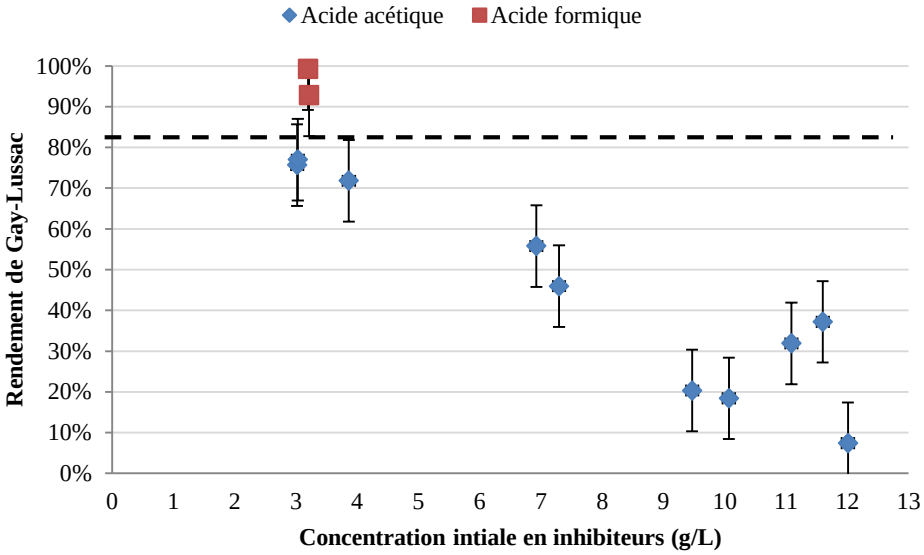


Figure 87 : Rendements de Gay-Lussac après 48h de fermentation en présence d'acide d'acétique et d'acide formique en fonction des concentrations initiales en inhibiteur

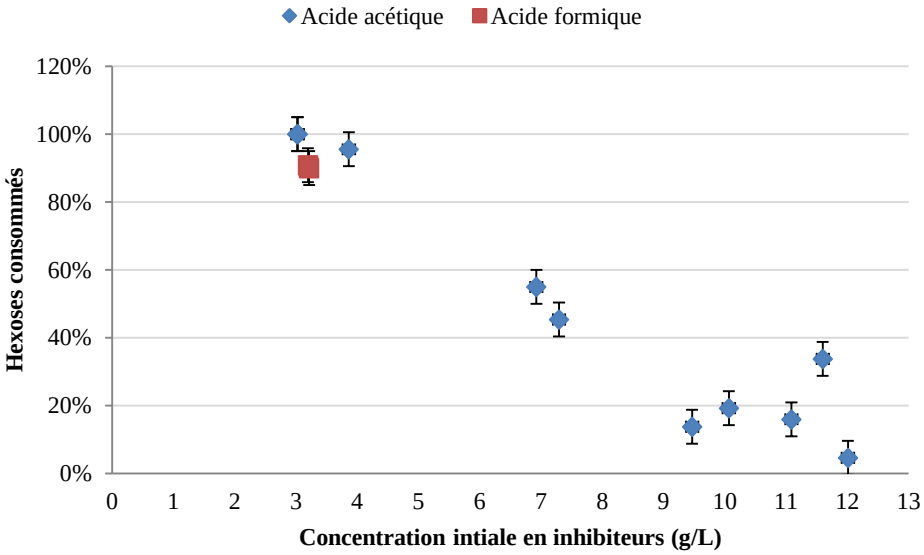


Figure 88 : Hexoses consommés après 24h de fermentation en présence d'acide acétique et d'acide formique en fonction des concentrations initiales en inhibiteur

3 Effet simultané du HMF, du furfural et de l'acide acétique

Des milieux complets ont été étudiés, contenant simultanément les trois inhibiteurs considérés habituellement comme les plus néfastes d'après la littérature : l'acide acétique, le HMF et le furfural. Il était difficile d'évaluer toutes les synergies possibles entre les différents inhibiteurs, celle-ci semblait la plus pertinente. Quatre milieux complets ont été utilisés, dont les concentrations sont données dans le Tableau 36. Les deux premiers présentent des concentrations similaires à celles trouvées dans des hydrolysats résultant d'hydrolyses acides ou d'une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire. Les milieux 3 et 4 simulent des hydrolysats concentrés d'hydrolyse acide.

	Complet 1	Complet 2	Complet 3	Complet 4
Acide acétique	3,64 ± 0,1	3,62 ± 0,1	10,66 ± 0,2	10,50 ± 0,2
HMF	2,14 ± 0,1	2,06 ± 0,1	7,40 ± 0,2	7,44 ± 0,2
Furfural	0,51 ± 0,1	0,63 ± 0,1	7,44 ± 0,2	6,14 ± 0,2

Tableau 36 : Concentration (g/L) en acide acétique, HMF et furfural dans les milieux de fermentation complets utilisés

Les milieux 3 et 4, aux teneurs en inhibiteurs importantes, ne permettent pas la production d'éthanol, même après 24 heures de fermentation. Les milieux 1 et 2 présentent de faibles rendements après 4 heures, ce qui signifie que la phase de latence est relativement longue (Figure 89). Cependant après 24h et 48h de fermentation, ces milieux ont un comportement similaire à ceux des milieux de fermentation contenant l'acide acétique : ils présentent des rendements identiques aux fermentations effectuées avec de l'acide acétique seul aux même concentrations. Il semble donc que les furanes n'ont qu'un effet néfaste limité comparativement à l'acide acétique. Ceci avait du reste déjà été observé [66].
Après 48h, les levures présentes dans les milieux 1 et 2 ont métabolisé l'ensemble des hexoses disponibles. Les rendements ne sont cependant pas très élevés, comme cela avait déjà été observé avec les acides organiques.
Il est également intéressant de noter que les comportements de ces milieux complets sont très proches de ceux observés précédemment sur des hydrolysats réels (partie A de ce chapitre).

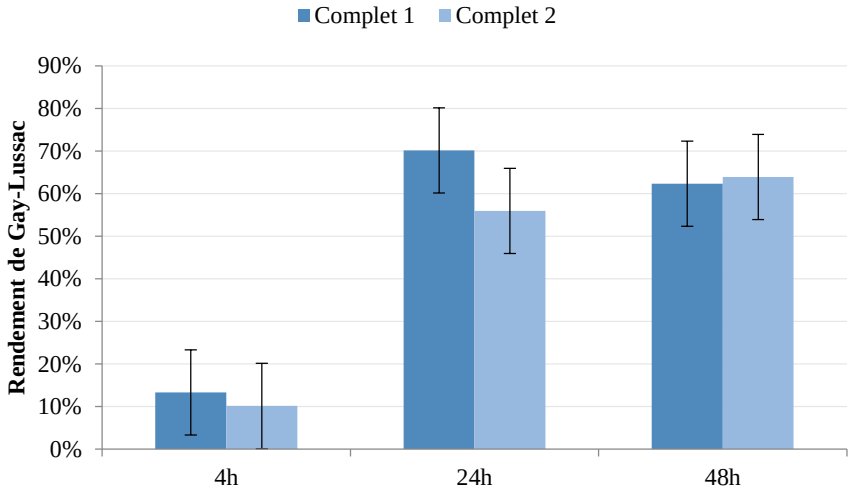


Figure 89 : Rendements de Gay-Lussac après 4, 24 et 48h de fermentations des milieux complets 1 et 2

4 Bilan sur l'étude de l'impact des inhibiteurs

Dans les hydrolysats obtenus dans le chapitre II, les acides organiques sont les principaux inhibiteurs. L'acide acétique est irrémédiablement présent en concentration importante. Il peut cependant être retiré du milieu par évaporation. L'acide lévulinique, présent en faible quantité n'a pas d'influence seul. L'acide formique est, à concentration égale, le plus toxique des trois. Même en faible quantité, il a un impact négatif important sur la productivité volumétrique. Les lignosulfonates utilisés pour simuler la présence de composés aromatiques ont également un effet négatif. La production d'éthanol n'est pas totalement inhibée, et les saccharides sont métabolisés par les levures. Néanmoins, les rendements en éthanol sont significativement plus faibles que les rendements obtenus suite aux fermentations témoins.
Les autres inhibiteurs, furanes et extractibles, ont peu d'influence quand ils sont présents seuls. Les furanes augmentent toutefois l'inhibition des milieux de fermentation quand ils sont ajoutés aux acides organiques, notamment en allongeant la phase de latence.
Dans ces conditions, fermenter directement un hydrolysat concentré sera difficile. L'ajout d'un stade de détoxification parait inéluctable. Retirer les acides organiques serait alors prioritaire, puis si nécessaire les composés dérivés de la lignine.
Une autre voie peut également être explorée. Les levures utilisées jusqu'ici ont été plongées directement dans des milieux contenant parfois de fortes concentrations en inhibiteurs. Le brusque changement peut être trop important pour les levures. Elles pourraient éventuellement se développer dans ces milieux si, au préalable, elles étaient petit à petit acclimatées à leur nouvel environnement. Ceci fait l'objet de la partie suivante.

C. Acclimatation de levures

L'acclimatation est un procédé très utilisé et efficace pour améliorer les rendements et la productivité volumétrique des fermentations. Effectué sur une courte période, elle permet à un microorganisme de s'adapter à un nouvel environnement. Les modifications apportées à l'organisme ne sont pas permanentes. L'acclimatation peut aussi s'accompagner d'une

sélection génétique des meilleures levures : celles qui se développent le mieux dans le nouvel environnement. Il ne faut cependant pas confondre ce procédé avec l'adaptation d'un microorganisme à un environnement sur le long terme. Ce dernier procédé, effectué sur plusieurs mois, permet au microorganisme d'évoluer, par sélection « naturelle », pour s'adapter à un environnement. Les modifications, inscrites dans leur code génétique, sont alors permanentes.

Ce procédé d'acclimatation a été appliqué à la souche de *S. cerevisiae* utilisée jusqu'ici (souche appelée SIGMA). De plus, quatre autres souches du même organisme, fournies par la *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, université située à Quito, en Equateur, ont été utilisées. Ces quatre souches sont référencées à la *colección de levaduras quito católica* (CLQCA), bibliothèque regroupant l'ensemble des microorganismes étudiés sur le sol équatorien. Elles y sont désignées sous les sigles 1900-1, 10.386, INT-005 et INT-041. Elles ont été sélectionnées parmi l'ensemble des souches de *S. cerevisiae* de cette bibliothèque pour leurs bonnes productivités en éthanol.

Un hydrolysat de base a été utilisé. Il résulte d'une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire, d'une dépolymérisation puis d'une concentration par évaporation pour atteindre 100 g/L d'hexoses. De l'acide acétique et du furfural y ont été ajoutés pour compenser les pertes dues à l'évaporation, ainsi qu'un milieu nutritif sans source carbone, appelé YNB (*Yeast Nitrogen Base)*. La composition est donnée dans le Tableau 37. Une autre solution a été créée, contenant les mêmes quantités de source de carbone (sous forme de glucose) et d'azote (toujours avec du YNB) que l'hydrolysat. L'acclimatation a alors consisté à placer les levures dans un mélange d'hydrolysat et de cette solution, et à y augmenter la part d'hydrolysat toutes les 24h, de 0% à 25%, 50%, 75% puis 100% si possible. Les concentrations en espèces inhibitrices de ces milieux sont données dans le Tableau 38.

	Concentration (g/L)
Arabinose	11,2 ± 0,6
Galactose	15,7 ± 0,8
Glucose	17,4 ± 0,9
Xylose	19,5 ± 1,0
Mannose	52,9 ± 2,7
HMF	2,0 ± 0,1
Furfural	3,7 ± 0,2
Acide acétique	11,5 ± 0,6
Acide formique	3,2 ± 0,2
Acide lévulinique	3,0 ± 0,2

Tableau 37 : Composition du milieu de fermentation utilisé pour l'acclimatation

	Part d'hydrolysat dans le milieu de fermentation			
	25%	50%	75%	100%
HMF	0,5	1,0	1,5	2,0
Furfural	0,9	1,9	2,8	3,7
Acide acétique	2,9	5,7	8,6	11,5
Acide lévulinique	0,8	1,6	2,4	3,2
Acide formique	0,8	1,5	2,3	3,0

Tableau 38 : Concentrations en espèces inhibitrices dans les milieux de fermentation utilisés pour l'acclimatation des levures (g/L)

Afin d'évaluer les bénéfices éventuels de l'acclimatation, des essais de fermentation témoin ont été effectués avec toutes les souches dans des milieux contenant 50 et 75% d'hydrolysat. La fermentation s'est avérée impossible après 24 heures, quel que soit la souche.

1 Première série d'essais d'acclimatation

Pour cette série d'essais, les levures étaient transférées d'un milieu au suivant, après centrifugation, à l'aide d'une micropipette. Pour un milieu de fermentation de 4 mL, 0,3 mL de solution riche en levure y était ajoutés. Cependant, la concentration en levures était trop faible pour métaboliser l'ensemble des hexoses en 24h, même dans un milieu idéal composé de YNB et de glucose. Les résultats obtenus sont cependant riches d'enseignement.
Les rendements de Gay-Lussac obtenus sont donnés en Figure 90. L'acclimatation a été stoppée à 50% de teneur d'hydrolysat, du fait de la faiblesse des rendements à ce stade.
Dans le milieu sans hydrolysat (0%), la levure SIGMA obtient d'excellents résultats comparés aux autres levures. Ceux-ci sont certainement dus à une concentration initiale plus élevée en levures. Ces milieux ont servi aux autres levures à se multiplier, alors que la levure Sigma était déjà présente en quantité importante. En théorie, toutes les levures devraient atteindre de bons rendements dans ce milieu, si elles sont présentes en quantité suffisante.
Quand la teneur en hydrolysat du milieu de fermentation augmente, la levure SIGMA est rapidement inefficace. Ce résultat est concordant avec les premiers essais de fermentation d'hydrolysats réels, qui n'ont donné aucun résultat même avec de faibles concentrations en inhibiteurs.
Les levures INT-005, INT-041 et 1900-1 voient leurs rendements de fermentation augmenter dans un milieu à 25%, signe qu'elles peuvent s'y développer aisément. Ces rendements chutent néanmoins dans un milieu à 50%.
La levure 10 386 semble ne pas pouvoir se développer dès le début de cette acclimatation.

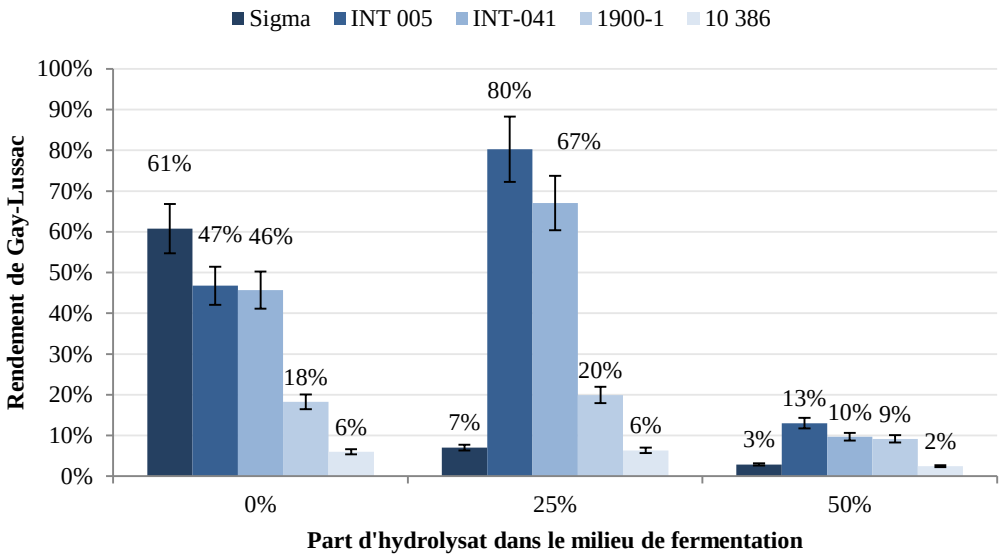


Figure 90 : Rendements de Gay-Lussac obtenus lors de la première acclimatation

2 Seconde série d'essais d'acclimatation

A la suite des essais précédents, il a été décidé de recommencer une campagne d'acclimatation en changeant de stratégie. Dorénavant, les levures resteront dans les tubes de fermentation, seul le milieu sera changé. Cela devrait garantir une concentration suffisante en microorganismes. Cette nouvelle acclimatation sera opérée sur les quatre souches équatoriennes, mais pas sur la levure SIGMA, dont l'inefficacité dans un milieu ne contenant que 25% d'hydrolysat a été montrée.

2.1 Rendements de fermentations

Lors des fermentations préliminaires de 24h dans le milieu nutritif (0% d'hydrolysat), les quatre levures sont parvenues à transformer la totalité des hexoses en éthanol.

L'acclimatation a été poursuivie jusqu'à 75% d'hydrolysat (Figures 91 et 92). Avec 25% d'hydrolysat, les rendements obtenus sont excellents. La totalité du glucose et du mannose est métabolisée par les levures INT-005, 1900-1 et 10 386. Parmi les hexoses, seul le galactose subsiste. La levure 041, pour laquelle une partie du glucose et du mannose n'a pas été consommée après 24h, semble moins efficace. Cependant, le calcul du rendement de Gay-Lussac sur les hexoses effectivement consommés montre que cette souche est efficace dans la transformation des C6 en éthanol, il lui faut juste plus de temps pour achever la fermentation (Figure 93).

Cela se confirme pour le milieu de fermentation contenant 50% d'hydrolysat. La souche 041 est beaucoup moins productive que les autres, n'atteignant qu'un rendement de 12 ± 1% par rapport aux hexoses présents initialement. Les souches 1900-1 et 005 accusent également une baisse de productivité volumétrique, qui se traduit par des rendements sur les sucres consommés élevées, mais des rendements globaux de 74 ± 7% et 69 ± 7% respectivement. Après 24h, glucose, mannose et galactose sont encore présents dans l'ensemble des milieux de fermentation. La levure 10 386 montre un rendement sur les sucres consommés plus faible que

les autres, ce qui pourrait être le signe que le milieu est trop inhibé pour elle, comme il avait déjà été observé lors de la première série d'essais.

Ces tendances se confirment pour les fermentations effectuées dans des milieux contenant 75% d'hydrolysat. Du fait de la baisse globale de productivité volumétrique observée il a été décidé d'effectuer ces fermentations sur 72 heures. Les souches 10 386 ainsi que 041 atteignent de faibles rendements, que ce soit sur les hexoses présents initialement ou sur les hexoses consommés. Le fait que les levures utilisent les hexoses à d'autres fins que la production d'éthanol dans des milieux fortement inhibés avait déjà été observé lors des fermentations d'hydrolysats concentrés sans acclimatation (partie A.1 de ce chapitre). La souche 005 permet de produire de l'éthanol, mais son rendement sur les saccharides montre que l'inhibition commence à la toucher. Seule la souche 1900-1, qui s'était déjà montrée la plus efficace précédemment, permet de métaboliser 70 ± 8% des hexoses en éthanol. La fermentation n'est pas achevée, du glucose, du mannose et du galactose sont encore décelés après ces trois jours de fermentation. Néanmoins, le rendement de fermentation pour la souche 1900-1 calculé sur les sucres consommés, qui est de 88 ± 9%, est très bon et prouve que l'inhibition affecte uniquement sa productivité.

Fermenter sans détoxification un hydrolysat concentré jusqu'à obtenir 75 g/L d'hexoses est donc faisable. Les concentrations en éthanol obtenues, aux alentours de 30 g/L, correspondent à l'objectif minimum fixé avant la distillation (cf chapitre I, partie C.2.6). La productivité est cependant faible, plus de trois jours sont nécessaires.

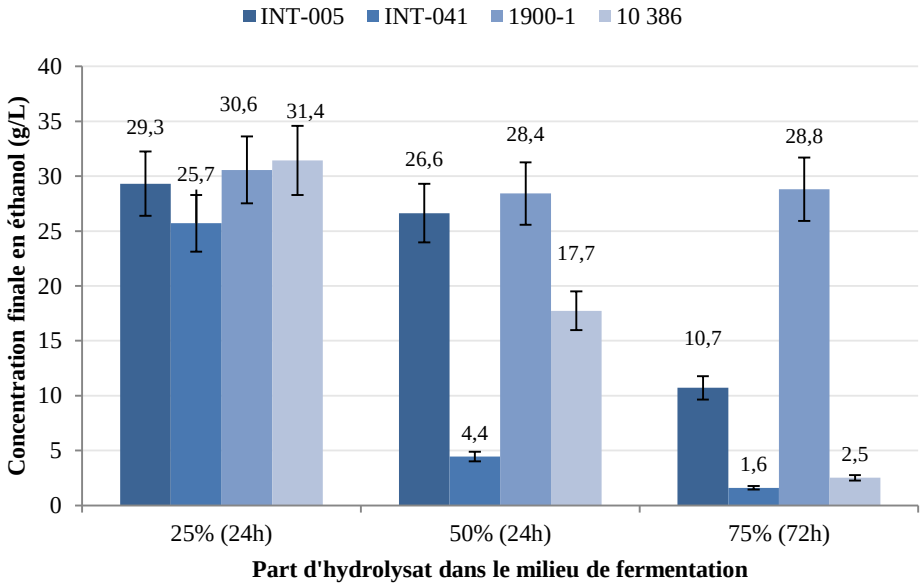


Figure 91 : Concentrations finales en éthanol mesurés lors de l'acclimatation pour des fermentations de 24h avec 25% et 50% d'hydrolysat, et une fermentation de 72h avec 75% d'hydrolysat

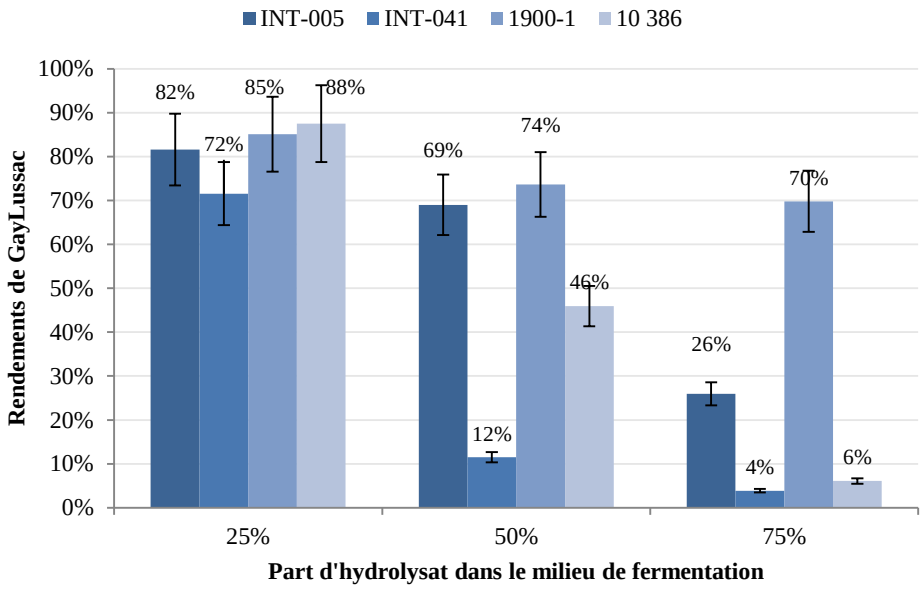


Figure 92 : Rendements de Gay-Lussac mesurés lors de l'acclimatation pour des fermentations de 24h avec 25% et 50% d'hydrolysat, et une fermentation de 72h avec 75% d'hydrolysat

Les essais ont été poursuivis avec des hydrolysats purs (100%). Ils n'ont pas donné de résultats satisfaisants, les quantités d'éthanol obtenues après 72h étant très faibles. La limite pour fermenter les hydrolysats se situe donc entre 75 et 100 g/L d'hexoses.

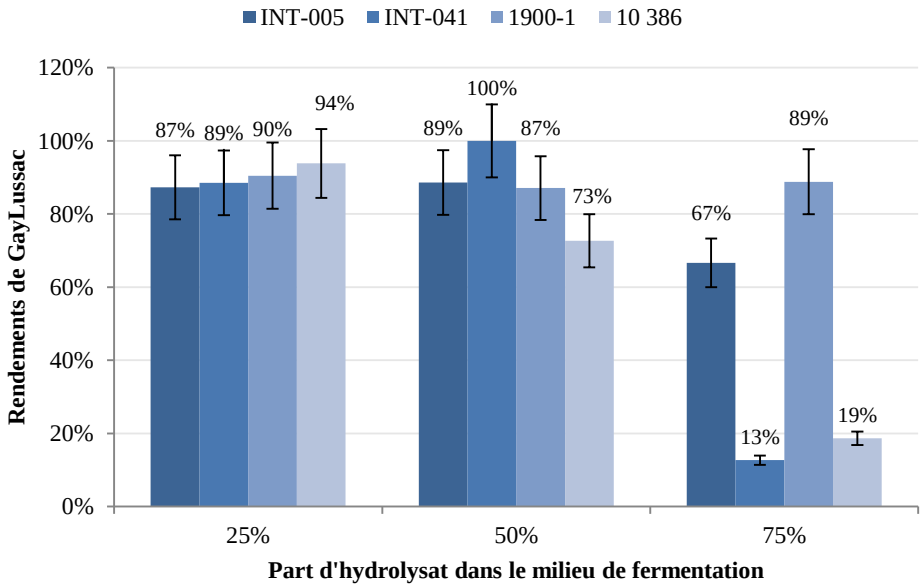


Figure 93 : Rendements de Gay-Lussac calculés sur les hexoses effectivement consommés pendant les fermentations de 24h avec 25% et 50% d'hydrolysat, et une fermentation de 72h avec 75% d'hydrolysat

2.2 Impacts sur les furanes

L'action des levures sur les furanes, seuls inhibiteurs à être métabolisés, peut permettre de comprendre le succès ou non d'une fermentation. Tout d'abord, comme il a déjà été observé

précédemment, le furfural est beaucoup plus facilement métabolisé que le HMF. Ainsi, seul le milieu contenant 75% d'hydrolysat ayant subi une fermentation effectuée avec la souche 041 contient du furfural, à raison de 0,04 ± 0,01g/L, soit une consommation de 98 ± 1% du furfural présent initialement. Donc, bien que présent en quantités plus importantes que le HMF, le furfural est métabolisé par les levures, même dans les milieux très inhibés dans lesquels peu ou pas d'éthanol est produit.

Le HMF n'est pas métabolisé aussi facilement (Figure 94). Sa transformation en 2,5-bis-hydroxymethylfurane est directement corrélée aux rendements de fermentation. Avec des milieux ne contenant que 25% d'hydrolysat, le HMF est entièrement métabolisé par les levures. Quand ce taux atteint 50%, seule la souche 041, qui ne présente qu'un rendement de 12 ± 1%, ne parvient pas à transformer l'ensemble du HMF. Pour les milieux de fermentation contenant 75% d'hydrolysat, plus la quantité de HMF métabolisée est importante, plus le rendement de fermentation est élevé. La capacité des levures à réduire l'inhibition due aux furanes serait donc importante pour pouvoir fermenter les sucres en éthanol. Il ne faut toutefois pas oublier que ces fermentations contiennent d'autres inhibiteurs qui ne sont pas éliminés par les levures, notamment des acides organiques. C'est la synergie entre ces inhibiteurs qui rend impossible certaines fermentations. La présence de furanes seuls aux concentrations d'un hydrolysat concentré comme celui utilisé pour cette acclimatation a un effet minime sur la fermentation, comme il a été vu plus haut.

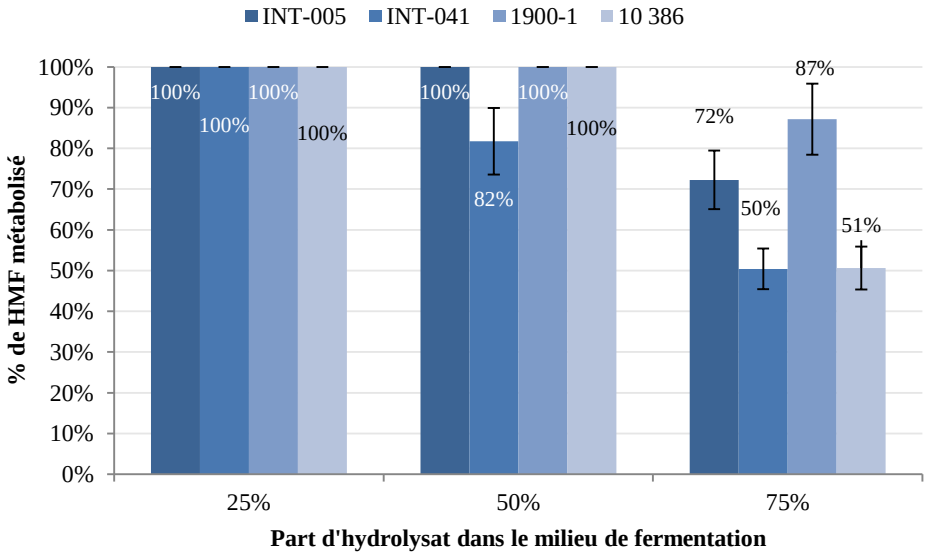


Figure 94 : Quantité de HMF métabolisé par les levures pendant les fermentations de 24h avec 25% et 50% d'hydrolysat, et une fermentation de 72h avec 75% d'hydrolysat

D. Résumé du chapitre

Les fermentations d'hydrolysats résultant d'une hydrolyse acide ou d'une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire sont possibles en moins de 24 heures sans procéder à une étape de détoxification. Néanmoins, s'il est nécessaire de concentrer ces hydrolysats avant la fermentation, les quantités d'inhibiteurs deviennent intolérables pour les levures. La présence d'acides organiques surtout peut totalement inhiber la fermentation. Aux concentrations

obtenues dans des hydrolysats concentrés, l'acide lévulinique n'est pas néfaste seul, au contraire de l'acide formique qui réduit fortement la productivité d'éthanol et de l'acide acétique qui va même jusqu'à empêcher toute fermentation. Les lignosulfonates utilisés pour évaluer l'effet des composés phénoliques semblent également avoir un effet négatif, réduisant les rendements en éthanol. Les furanes sont en revanche peu néfastes aux concentrations testées. L'acclimatation de souches de *S. cerevisiae* a toutefois permis de les rendre plus tolérantes aux inhibiteurs. Ainsi, un hydrolysat concentré pour atteindre 50 g/L d'hexoses peut être fermenté en 24h. En le concentrant jusqu'à atteindre 75 g/L d'hexoses, il est possible également de le fermenter, mais les fortes concentrations en espèces inhibitrices réduisent fortement la productivité des levures, et plus de trois jours sont nécessaires pour atteindre une fermentation complète. Cela correspond à une concentration en acide acétique dans le milieu de fermentation de 8 à 9 g/L.

Il est donc envisageable de fermenter un hydrolysat relativement concentré obtenu selon les conditions du chapitre II sans utiliser de stade de détoxification.

Chapitre IV : Aspects technico-économiques

Il existe quelques études technico-économiques traitant de l'extraction des hémicelluloses avant un procédé kraft et de leur transformation en éthanol. Trois d'entre elles ont été sélectionnées, utilisant trois procédés différents : une NNE, une extraction alcaline et une hydrolyse acide. Ces procédés seront comparés les uns aux autres, ainsi qu'avec le procédé développé dans les chapitres II et III utilisant une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire acide. Les détails de ces études sont disponibles dans l'annexe II. En préambule, une rapide étude de marché va permettre de savoir dans quelles mesures une usine kraft va trouver des débouchés pour l'éthanol si elle choisissait de se convertir.

A. Marché potentiel pour la production de bioéthanol dans les usines kraft

Avant de se lancer dans la production d'un nouveau produit, il est nécessaire de s'assurer qu'un marché existe. Cette partie est donc consacrée au marché potentiel du bioéthanol produit au sein des usines kraft. La demande européenne en bioéthanol ne peut qu'augmenter dans les prochaines années, ne serait-ce que pour atteindre les objectifs fixés par l'UE. Celle-ci exige en effet que 10% de l'énergie utilisée dans les transports soit produite à partir de sources renouvelables à l'horizon 2020 (cf. chapitre I, partie A.1). Une simulation a été effectuée au niveau du monde, de l'UE (27 pays) et de la France pour déterminer quelle part prendrait l'éthanol hémicellulosique produit dans une usine kraft, par rapport à la demande future. Seules les usines produisant de la pâte blanchie de résineux sont considérées comme étant intéressées pour la production de bioéthanol. En effet, la fabrication de pâte écrue ne peut accepter la moindre dégradation de la cellulose. Ces pâtes étant destinées à l'emballage, elles nécessitent des caractéristiques de résistance élevées. Les données utilisées datent de 2010. La production potentielle maximum d'éthanol dans ces usines kraft a été calculée sur les bases de l'extraction de 70% des GGM, avec un rendement de fermentation de 90% (Tableau 39). Au regard des données de 2010, les productions potentielles d'éthanol sont relativement modestes comparées aux consommations d'essence. Si l'ensemble des usines kraft françaises produisant de la pâte blanchie à partir de résineux se lançaient dans la production d'éthanol, elles produiraient moins de 0,25% de la consommation française en essence. Le même calcul effectué à plus grande échelle montre que l'UE pourrait produire sous forme d'éthanol 0,66% de sa consommation d'essence. Comme la production de pâte blanchie ne devrait pas augmenter en UE d'ici à 2020, il est certain que le bioéthanol produit dans ces usines trouverait des débouchés, ne serait-ce que pour contribuer à atteindre les 10% d'énergie renouvelable dans les transports d'ici 2020, fixés par la directive 2009/28/CE (cf. chapitre I partie C.1). Les gouvernements concernés pourraient même encourager ces usines à se convertir.

	Monde	UE	France
Bois utilisé (kT)	59 443	16 622	488
Production pâte kraft (blanchie (kT)	35 666	9 973	293
GGM extraits (kT)	6 658	1 862	55
Ethanol produit (kT)	3 062	856	25
Ethanol produit (ktep)	2 092	585	17
Consommation essence (ktep)	906 297	88 704	7 531

Tableau 39 : production potentielles de bioéthanol dans les usines de pâtes (données sur la production de pâte de 2010 (production de pâte :[183], consommation d'essence :[29], [99])

B. Aspects économiques de la fabrication d'éthanol hémicellulosique dans une usine kraft

Cette partie reprend les conclusions de trois études technico-économiques utilisant trois prétraitements différents pour extraire les hémicelluloses. Une comparaison avec le procédé autohydrolyse/hydrolyse secondaire développé dans les chapitres II et III de cette thèse a ensuite été faite.

1 Etude d'un procédé utilisant l'extraction en milieu quasi-neutre

L'étude économique de ce procédé a été développé par Mao [78], [172]. Il s'agit donc d'appliquer une NNE (cf. chapitre I partie B.3.2 et chapitre II partie B.2.3) à partir de liqueur verte diluée sur des copeaux de feuillu. Les copeaux sont ensuite lavés avant la cuisson. Les eaux de lavage contenant des saccharides sont mélangées aux hydrolysats. Une série de *flash tanks* est utilisée pour concentrer ces derniers, tandis qu'une partie est recyclée en début d'extraction. L'hydrolysat subit ensuite une hydrolyse secondaire acide. Les xylanes extraits sont fermentés en éthanol. De plus, les acides uroniques sont fermentés en acide acétique. Celui-ci, ainsi que l'acide acétique provenant des groupes acétyles, est extrait de l'hydrolysat, purifié par distillation et valorisé comme sous-produit. La description complète du procédé est disponible dans l'annexe II.

1.1 Impact sur la balance énergétique

La comparaison entre le procédé kraft de base et sa version modifiée est effectuée pour une consommation de bois identique dans les deux cas. L'extraction d'une partie de la lignine et des hémicelluloses pendant le prétraitement a pour conséquence une réduction de la quantité de matière sèche disponible pour la cuisson, et donc une réduction de la quantité de liqueur générée lors de la cuisson kraft. Ainsi, la quantité d'énergie générée par tonne de bois est réduite de 10%. De plus, l'énergie nécessaire au procédé global augmente, l'énergie requise par l'extraction et la production d'éthanol n'étant compensée qu'en partie par les économies réalisées lors de la cuisson (Figure 95). Il est à noter également que l'énergie allouée à la distillation ne représente que 15% de l'énergie totale nécessaire à la production d'éthanol, malgré une concentration en sucres fermentescibles de 24,5 g/L, soit une concentration en

éthanol inférieure à 12 g/L en entrée de colonne de distillation. Du reste, dans cette étude, l'ajout d'une étape d'évaporation a été envisagé et abandonné car elle s'est finalement avérée non rentable.
L'usine reste néanmoins excédentaire en énergie, même si sa production est réduite de plus de 35%.

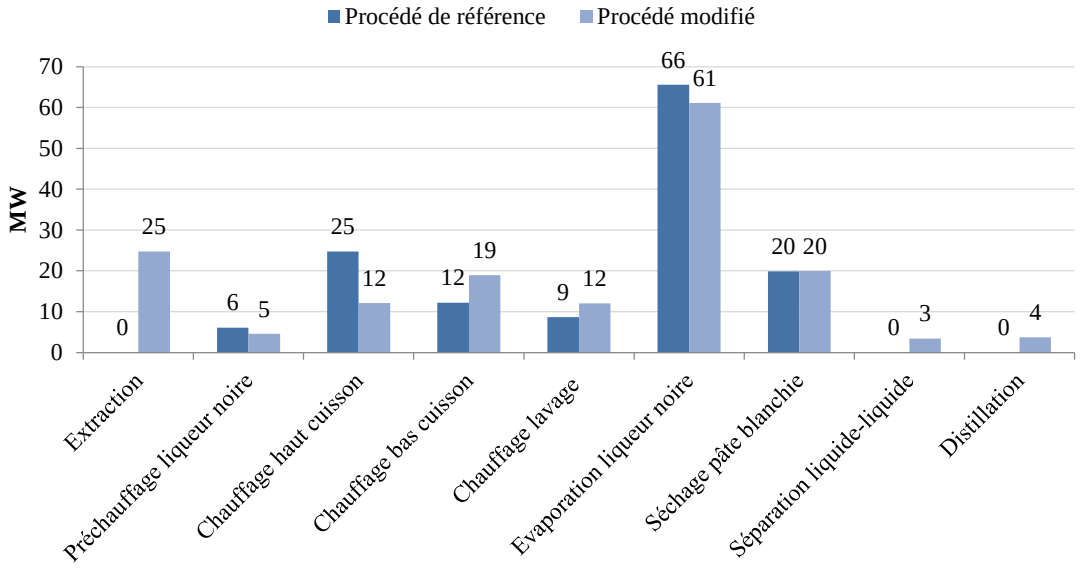


Figure 95 : Consommation énergétique par poste de l'usine kraft et de l'usine modifiée (production de 1000 T de pâte par jour) [78]

1.2 Impact sur la balance économique

D'après cette étude, le rendement économique de la modification de l'usine dépend avant tout des investissements à réaliser ou non. Par exemple, l'acquisition d'un réacteur pour effectuer l'opération d'extraction des hémicelluloses est rédhibitoire. Ainsi, l'étude est effectuée en supposant qu'un réacteur existe déjà et ne nécessite que quelques adaptations. De même, la rentabilité dépend de la nécessité d'augmenter la capacité du circuit de traitement des effluents, ou s'il est suffisant tel quel.
Le coût de production de l'éthanol a été calculé selon divers scénarios (Tableau 40). Les scénarios envisagés incluent la taille de l'usine, l'acquisition ou non d'un réacteur d'extraction et la nécessité ou non d'investir dans la station d'épuration. Ces coûts de production ont été calculés pour obtenir un retour sur investissement de 12 ans. Plus la taille de l'usine est importante, plus faible sont les coûts de production, les investissements étant amortis plus facilement. Le cours de l'éthanol en 2007 était d'environ 530 $/m^3. Les procédés économiquement viables sont en gras dans le tableau, et démontrent que la possibilité de trouver un réacteur pour effectuer l'extraction sur le site, plutôt que d'en acquérir un nouveau, est indispensable.

Production pâte usine	Réacteur d'extraction	mise à niveau station d'épuration	Coûts de production ($/m^3)	
			Ethanol	Acide acétique
750 T/j	Ancien mis à niveau	oui	**475**	631
	Ancien mis à niveau	non	**435**	580
	Nouveau	oui	586	778
	Nouveau	non	549	728
1000 T/j	Ancien mis à niveau	oui	**467**	617
	Ancien mis à niveau	non	**430**	573
	Nouveau	oui	567	752
	Nouveau	non	533	707
1500 T/j	Ancien mis à niveau	oui	**456**	607
	Ancien mis à niveau	non	**425**	565
	Nouveau	oui	546	726
	Nouveau	non	**515**	683

Tableau 40 : Coûts de production de l'éthanol et de l'acide acétique selon différents scénarios (retour sur investissements de 12 ans, $ de 2007) [172]

La production d'éthanol et d'acide acétique en parallèle de la pâte à papier peut donc être économiquement viable sous certaines conditions. L'usine produit moins d'énergie, tout en restant excédentaire. Ce procédé reste tributaire de l'efficacité de l'extraction liquide-liquide de l'acide acétique et des fermentations des saccharides et de l'acide glucuronique par deux souches d'*E. coli* génétiquement modifiées.

2 Etude d'un procédé utilisant l'extraction alcaline des hémicelluloses

Une étude de Huang et al. est basée sur l'extraction d'hémicelluloses de copeaux de feuillu avec de la soude, et leur valorisation sous forme d'éthanol [39] (scénario S2). L'extraction s'effectue à une concentration en soude de 1,67M, soit 26,7 g pour 100 g de bois. L'hydrolysat est ensuite filtré (nanofiltration) pour le concentrer et recycler la soude vers le stade d'extraction. Il subit alors une hydrolyse secondaire, est concentré dans des *flash tanks* et est détoxifié par *overliming*. Ses hexoses et pentoses sont finalement fermentés par une souche de *Zymomonas mobilis.* Le détail du procédé est disponible dans l'annexe II.

2.1 Impact sur la balance énergétique

L'évolution des performances énergétiques est similaire à celle observée dans l'étude précédente. Du fait de la plus faible quantité de matière organique envoyée à la chaudière, la quantité de vapeur produite décroit de 19,5%. Selon ce procédé, la consommation de vapeur diminue également, de 7%. Néanmoins, l'usine, même si elle reste excédentaire, voit sa production en vapeur nette baisser de plus de 55%.

2.2 Impact sur la balance économique

Le coût de production de l'éthanol a été calculé pour une consommation de bois identique de 2 000 T/j, que ce soit pour l'usine kraft ou l'usine modifiée. Cela représente une production de 1 070 T/j de pâte non blanchie dans le premier cas, et 960T/j dans le second. Pour un retour sur investissement global de 7 ans, le coût de production d'éthanol s'élève à 900 $/m^3 (2010). Ce chiffre est éminemment supérieur à ceux présentés pour le procédé NNE dans la partie précédente. Plusieurs raisons l'expliquent. Tout d'abord, le procédé NNE étuié permet la production d'acide acétique comme autre source de revenus pour l'usine. De plus, le retour sur investissement se fait sur 7 ans, pour 12 ans précédemment.

3 Etude d'un procédé utilisant l'hydrolyse acide des hémicelluloses

La dernière étude rapportée ici utilise une hydrolyse acide pour extraire les hémicelluloses de bois de résineux [67]. Plusieurs sévérités d'hydrolyses acides sont testées. Après extraction, l'hydrolysat passe dans des *flash tanks* puis est détoxifié en traversant des résines échangeuses d'ions. Les hexoses et pentoses sont ensuite fermentés. Par ailleurs, après le prétraitement, les copeaux sont lavés, mais les saccharides récupérés dans les eaux de lavage ne sont pas valorisés. La détail du procédé est disponible dans l'annexe II.
Par rapport aux procédés précédents, l'hydrolyse acide a l'avantage de permettre l'extraction d'une quantité plus importante d'hémicelluloses, et donc d'atteindre une production d'éthanol plus élevée. Ce procédé présente également quelques inconvénients : les propriétés de la pâte sont moins bonnes et le rendement global du procédé diminue fortement avec l'ajout du prétraitement, ce qui signifie que la production de pâte va diminuer pour un apport initial en bois constant.

A la différence des études précédentes, l'objectif de celle-ci est de conserver la production de pâte constante, avec en outre un même indice kappa et une même blancheur de la pâte, ce qui induit une surconsommation de bois. Celui-ci contenant en proportion plus importante de lignine à mesure que la quantité d'hémicelluloses extraite augmente, il faut donc un flux de bois plus important pour conserver un flux de cellulose constant. Ainsi, l'extraction de 18% du bois induit une augmentation de plus de 42% de la consommation de bois (Tableau 41). La quantité d'hémicelluloses extraite étant plus importante, les productions d'éthanol associées sont sans commune mesure avec celles observées dans les études précédentes à même taux de matière sèche extraite.
La production constante de pâte présente toutefois un grand inconvénient. La quantité de matière organique extraite lors de la cuisson kraft augmente fortement. Or cette matière est envoyée à la chaudière de régénération, qui doit pouvoir accepter cet afflux croissant de matière, ainsi que l'ensemble des équipements associés à la boucle de régénération (évaporateurs, four à chaux,…). Dans le cas le plus extrême, la chaudière doit traiter 30% de matière organique de

plus (Tableau 42). Le lessiveur n'est pas affecté de la même façon. La plus grande quantité de bois qu'il a à traiter est plus que compensée par la diminution du temps de cuisson, celle-ci étant plus rapide après le prétraitement De deux chose l'une, soit la boucle de régénération peut accepter une telle surcapacité, soit il faut investir, ce qui est rapidement coûteux en ce qui concerne la chaudière. D'autant plus que la chaudière de régénération constitue souvent le goulot d'étranglement d'une usine kraft.

	Quantité de bois extraite				
	Témoin	6%	10%	14%	18%
Approvisionnement en bois (T)	1,00	1,07	1,16	1,28	1,42
Ethanol produit (kg)	0,0	20,7	37,5	57,4	81,8
Pâte non blanchie produite (kg)	466	466	466	466	466

Tableau 41 : Consommation en bois, production d'éthanol et production de pâte pour les différents scénarios, en se basant sur production de 466 kg de pâte blanchie, soit une consommation d'1 T de bois dans le procédé témoin (d'après [67])

	Quantité de bois extraite				
	Témoin	6%	10%	14%	18%
Lessiveur	100%	72%	70%	69%	69%
Chaudière de régénération	100%	103%	110%	119%	131%

Tableau 42 : Capacité d'utilisation requise pour le lessiveur et la chaudière de régénération (d'après [67])

3.1 Impact sur la balance énergétique

L'extraction des hémicelluloses a pour conséquence l'augmentation de la quantité de matière organique brûlée à la chaudière de régénération, de manière plus importante que la consommation d'énergie. Ainsi, la production nette d'énergie est plus élevée que celle de l'usine kraft témoin avec seulement 6% du bois extrait (Tableau 43). De plus, cette production nette s'accroit à mesure que la quantité de bois extraite augmente.

	Quantité de bois extraite				
	Témoin	6%	10%	14%	18%
Production nette d'énergie (MWe)	21,2	33,1	35,4	38,0	41,5

Tableau 43 : Production nette en énergie selon les différents scénarios pour une usine produisant 427 kT/an de pâte non blanchie (d'après [67])

3.2 Impact sur la balance économique

Parmi les différences de coûts de fonctionnement entre la bioraffinerie définie ici et l'usine kraft de référence, les coûts dus aux investissements liés à la chaudière, à la boucle de régénération, à l'extraction des hémicelluloses et à la production d'éthanol prennent une part prépondérante (Figure 96). Les investissements nécessaires à l'augmentation de la capacité de la boucle de régénération sont en effets importants. De même, les coûts dus à la surconsommation de bois par rapport à l'usine de référence ne sont pas négligeables.

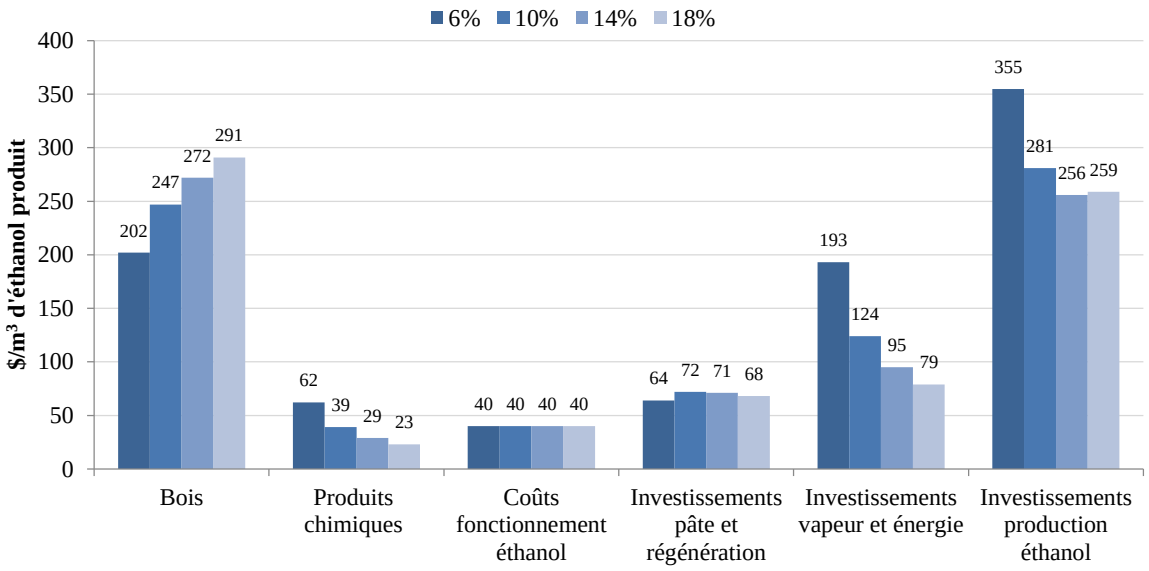


Figure 96 : Coûts de fonctionnement et amortissement des investissements des différents postes de la bioraffinerie selon le taux d'extraction lors du prétraitement (différence par rapport à l'usine kraft de base, amortissement des investissements sur 10 ans, $ de 2008) d'après [67]

Les coûts de production de l'éthanol sont résumés dans le Tableau 44. Ils ont été calculés pour une usine produisant 427 kT de pâte non blanchie par an. Malgré les gains dus à la surproduction d'énergie, le coût de production de l'éthanol reste relativement élevé. Il est le plus faible pour le prétraitement le plus sévère permettant d'extraire le plus de bois. Un calcul a également été effectué en considérant que la cellulose n'était pas affectée par le procédé d'extraction, alors que dans les faits, l'hydrolyse acide en hydrolyse et solubilise une partie. La cellulose extraite est alors transformée en éthanol. Mais si elle n'est pas extraite, elle permet de produire de la pâte, réduisant notamment la consommation en bois de l'usine. Par ailleurs, la vente de pâte à papier à partir de cellulose reste bien plus rentable que de la transformer en éthanol. Ainsi, les coûts de production de l'éthanol sont grandement diminués si la cellulose n'est pas affectée lors de l'hydrolyse acide.

	Quantité de bois extraite			
	6%	10%	14%	18%
Coûts de production de l'éthanol ($/m^3 d'éthanol)	771	679	647	647
Coûts de production de l'éthanol sans perte de cellulose ($/m^3 d'éthanol)	556	410	360	352

Tableau 44 : Coûts de production de l'éthanol selon la quantité de bois extraite lors du prétraitement (amortissement des investissements sur 10 ans, $ de 2008) d'après pour une usine produisant 427 kT de pâte non blanchie annuellement [67]

Pour conclure, choisir l'hydrolyse acide permet une production d'éthanol plus élevée que tout traitement alcalin. Néanmoins, la perte en rendement de pâte dû au prétraitement nécessite d'augmenter l'approvisionnement en bois et la capacité de la boucle de régénération, dont la chaudière de régénération. Les investissements à effectuer ont un impact important sur la rentabilité du procédé. Il faut noter que cette étude vend la cellulose produite comme pâte à papier. Or, il serait peut-être possible de la vendre comme pâte à dissoudre, produit à plus forte valeur ajoutée. La pâte à dissoudre demande une grande pureté de cellulose, avec une teneur en hémicelluloses inférieure à 5% notamment, ce qui peut être atteint ici grâce à leur extraction. Dans ce cas, la balance économique serait bien plus avantageuse.

4 Autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire selon le procédé mis au point dans cette thèse

4.1 Procédé proposé

Les paramètres globaux ont été définis pour un procédé d'extraction constitué d'une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse acide (cf. chapitre II). Les paramètres de cuisson ont été sélectionnés dans la thèse de Boiron [57], dans laquelle des cuissons kraft ont été effectuées sur des copeaux de résineux bruts et ayant subis une autohydrolyse. Deux cuissons aboutissant quasiment au même indice kappa que la cuisson de référence ont été retenues : l'une effectuée au même alcali que la référence mais en un temps deux fois plus court, et la seconde constituant un compromis entre un alcali plus faible et une durée de cuisson réduite (Tableau 45). Les différentes étapes du procédé proposé sont (Figure 97) :

- L'autohydrolyse des hémicelluloses
- Le lavage des copeaux avant la cuisson kraft. Les saccharides contenus dans les eaux de lavage ne sont pas valorisés.
- La concentration de l'hydrolysat dans des *flash tanks* pour augmenter leur concentration et extraire une partie de l'acide acétique et du furfural
- Le recyclage d'une partie de l'hydrolysat vers l'extraction des hémicelluloses
- L'hydrolyse secondaire (0,5% (w/w) d'acide sulfurique en solution à 140°C pendant 30 à 90 min selon la concentration de l'hydrolysat)
- La correction du pH à la chaux vive et extraction du gypse obtenu par filtration
- La fermentation des hexoses
- La distillation de l'éthanol et sa déshydratation sur tamis moléculaire

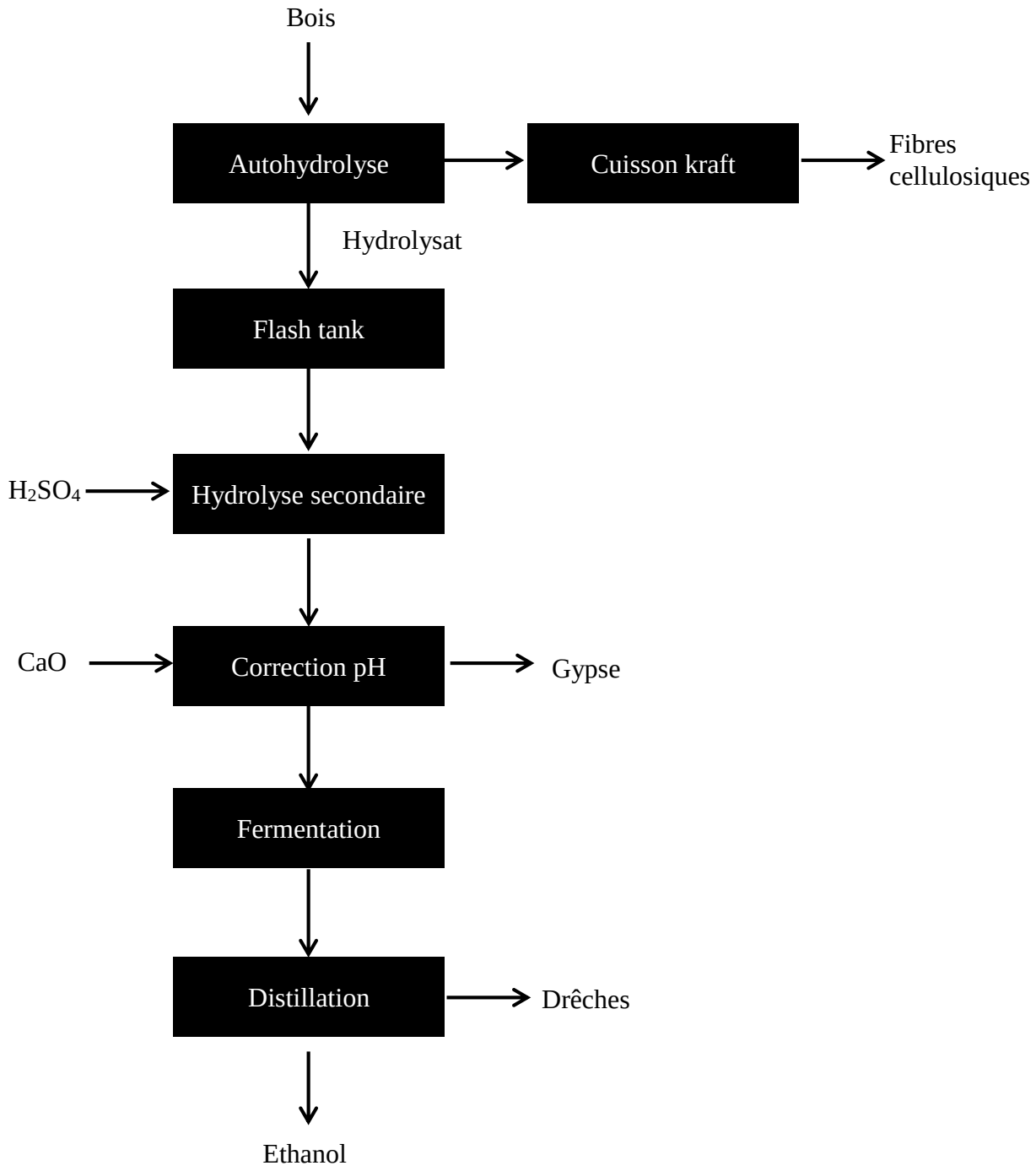


Figure 97 : Procédé proposé pour la fabrication simultanée d'éthanol et de fibres cellulosiques en utilisant l'autohydrolyse comme prétraitement

A noter que l'hydrolyse secondaire peut se faire avant l'évaporation flash. Dans ce cas, l'évaporation serait moins efficace du fait de la température en entrée plus faible. L'avantage serait alors que les composés inhibiteurs produits lors de l'hydrolyse secondaire pourraient être extraits lors de l'évaporation flash.

Par ailleurs, aucun procédé additionnel de détoxification n'a été ajouté, considérant que, à la vue des résultats du chapitre II, l'hydrolysat flashé, peu concentré, pourrait être fermenté directement.
Les données relatives au prétraitement et aux cuissons sont résumées dans le Tableau 45. Dans ce tableau, les productions d'éthanol sont données pour la fermentation des hexoses uniquement, mais également dans l'hypothèse de la fermentation de l'ensemble des saccharides.

		Référence	Procédé modifié	
			Même alcali	Alcali diminué
Prétraitement	% H_2SO_4 / bois (hydrolyse secondaire)		0,45 à 2%*	
	Temps montée en température		30 min	
	Temps à température		65 min	
	Température		170°C	
	Matériau extrait		18-25%	
	➢ Pentosanes		2,52%	
	➢ Hexosanes		8,27%	
	➢ Lignine		0,80%	
Cuisson kraft	Alcali	23%	23%	20%
	Sulphidité	30%	30%	30%
	Temps cuisson	120 min	60 min	105 min
	Température	170°C	170°C	170°C
	Facteur H	1820	910	1590
	Indice kappa final	23,3	24,2	26,3
	Rendement cuisson	47,7%	44,8%	44,0%
	Rendement global	47,7%	36,8%	36,1%
Production éthanol kg/ T bois (fermentation des C6)			42,2	42,2
Production éthanol kg/ T pâte (fermentation des C6)			114,6	116,9
Production éthanol kg/ T bois (fermentation des C6 et des C5)			46,3	46,3
Production éthanol kg/ T pâte (fermentation des C6 er des C5)			126,0	128,5

Tableau 45 : Données relatives au traitement autohydrolyse/hydrolyse secondaire (données sur les cuissons d'après [57]) *La quantité d'acide utilisée dépend de la concentration de l'hydrolysat lors de l'hydrolyse acide (paramètres de cuisson d'après [57])

4.2 Avantages et inconvénients de ce procédé

Le procédé le plus pertinent avec lequel comparer l'autohydrolyse est celui utilisant l'hydrolyse acide. D'un point de vue économique, le procédé demande une consommation d'acide sulfurique supérieure pour l'hydrolyse secondaire que pour l'hydrolyse acide. Néanmoins, ce surcoût peut être contrebalancé par le retrait du procédé de détoxification avec les résines échangeuses d'ions d'une part, et surtout l'impact plus faible sur la cellulose. Pour rappel, l'extraction d'une partie de la cellulose lors de l'hydrolyse acide multiplie presque par deux le coût de production de l'éthanol (Tableau 44). Or le procédé d'autohydrolyse n'impacte pas la cellulose, ce qui peut, en outre, permettre une diminution moindre des propriétés mécaniques de la pâte.

L'impact sur l'énergie produite par l'usine ou les investissements à apporter sont plus difficiles à évaluer. Des calculs ont été réalisés selon plusieurs scénarios par rapport à la référence : même consommation de bois, même production de pâte ou même intrants en matières organiques à la chaudière (Tableau 46). Deux niveaux d'extraction de bois ont été pris en compte, 75% (mesuré dans cette thèse) et 82% (mesuré par Boiron [57]). De plus, les deux cuissons dont les paramètres sont résumés dans le Tableau 45 ont été retenues.
Tout d'abord, quels que soient les paramètres de cuisson choisis, le lessiveur n'est jamais utilisé à 100%, ce qui signifie qu'il est possible d'utiliser la cuisson nécessitant un alcali plus faible que la référence, même si elle demande une durée plus longue.
En ce qui concerne l'utilisation de la chaudière, les résultats peuvent être comparés aux mêmes résultats calculés en utilisant une hydrolyse acide, et notamment lors de l'extraction de 14% de bois, qui donne une production similaire d'éthanol (Tableau 47). La capacité nécessaire à la chaudière est légèrement inférieure après l'utilisation d'une autohydrolyse. Néanmoins, cela vient surtout d'un rendement de cuisson plus élevé dû à un indice kappa final également plus élevé. Il n'y a donc pas véritablement de différence entre les deux procédés à ce niveau si ce n'est que la consommation de bois est plus importante lors de l'utilisation d'une autohydrolyse du fait des taux d'extraction plus importants.

	Référence	Conso. bois constante		Prod. pâte constante		Utilisation chaudière 100%	
Consommation bois (T)	1,00	1,00	1,00	1,43	1,31	1,26	1,15
Rendement extraction	100%	75%	82%	75%	82%	75%	82%
Rendement cuisson	47,7%	44,4%	44,4%	44,4%	44,4%	44,4%	44,4%
Capacité chaudière	100%	80%	87%	114%	114%	100%	100%
Capacité lessiveur cuisson 1	100%	38%	41%	54%	54%	47%	47%
Capacité lessiveur cuisson 2	100%	66%	72%	94%	94%	82%	82%
Production éthanol (kg/T de bois)	-	42,2	42,2	60,4	55,3	53,0	48,4
Production pâte avant blanchiment (kg/T de bois)	477	333	364	477	477	418	418

Tableau 46 : Capacités d'utilisation requises du lessiveur et de la chaudière, production de pâte et d'éthanol pour une usine utilisant une autohydrolyse (cuisson 1 : même alcali que la référence ; cuisson 2 : alcali plus faible cf. Tableau 45, d'après [57])

	Référence	Conso. bois constante			Prod. pâte constante			Utilisation chaudière 100%		
		6%*	14%*	18%*	6%*	14%*	18%*	6%*	14%*	18%*
Consommation bois (T)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,07	1,28	1,42	1,05	1,08	1,09
Rendement extraction	100%	94,0%	86,0%	82,0%	94,0%	86,0%	82,0%	94%	86,0%	82%
Rendement cuisson	46,6%	46,1%	42,4%	40,0%	46,1%	42,4%	40,0%	46%	42,4%	40%
capacité chaudière	100%	95%	93%	92%	102%	118%	131%	100%	100%	100%
Production éthanol (kg/T de bois)	-	19,2	45,0	57,5	20,7	57,4	81,8	20,3	48,5	62,4
Production pâte avant blanchiment (kg/T de bois)	466	433	365	328	466	466	466	457	393	356

Tableau 47 : Capacités d'utilisation requises de la chaudière, production de pâte et d'éthanol pour une usine utilisant une hydrolyse acide comme prétraitement (d'après [67]) *quantité de matière sèche extraite du bois durant l'hydrolyse acide

Comme pour l'étude précédente, il parait envisageable de convertir l'usine produisant de la pâte à papier en usine produisant de la pâte à dissoudre, et donc de rendre la conversion de l'usine plus avantageuse d'un point de vue économique. Une étude économique a été menée en ce sens pour en évaluer les perspectives. Elle permet de comparer les bénéfices que tirerait une entreprise

Pour cela, les hypothèses présentées dans le tableau 46 sont conservées. La différence entre le prix de la pâte à dissoudre et de la pâte kraft de résineux blanchie est comprise entre 127 et 355 $/T (cas le plus défavorable et cas le plus favorable). Le coût de production de l'éthanol est évalué à 704 $/m^3, d'après l'étude présentée dans la partie B.3 de ce chapitre, avec 14% d'extraction de bois (cas le plus proche du celui présenté ici). L'usine prise pour modèle produit 300 000 T de pâte blanchie par an avant sa transformation en bioraffinerie. Les détails de l'étude sont disponibles dans l'annexe III.

Les tableaux 48 et 49 donnent le résultat de ces études. Dans tous les cas de figure étudiés, le bilan est positif. De plus, les bénéfices faits par l'usine en produisant de la pâte à dissoudre à la place de pâte à papier permettent de compenser à eux seuls les coûts de production de l'éthanol (comprenant les amortissements des investissements). Par ailleurs, les coûts de production de l'éthanol sont légèrement plus importants que les résultats des ventes de ce même éthanol, ce qui signifie que l'usine a tout intérêt à produire de la pâte cellulosique. Dans le cas où le cours de la pâte à dissoudre est défavorable (Tableau 48), les bénéfices annuels sont supérieurs à 23 M$. Ils s'élèvent à plus de 70 M$ dans le cas la plus favorable (Tableau 49). Ces chiffres sont bien entendu à prendre avec des pincettes, le résultat dépendant des cours de la pâte et des coûts de production de l'éthanol calculés à partir du travail de Frederick et al présenté dans la partie précédente [67] et qui doivent différés des coûts liés à notre procédé. De plus, ces coûts sont choisis identiques dans tous les cas, alors qu'ils peuvent être différents, ne serait-ce que parce que certains cas demandent plus d'investissements que d'autre (pour la chaudière par exemple). Toutefois, de tels résultats permettent d'être optimiste quant à la réussite de la conversion d'une usine de pâte kraft en bioraffinerie produisant de la pâte à dissoudre et de l'éthanol.

	Référence	Conso. bois constante		Prod. pâte constante		Utilisation chaudière 100%	
Rendement extraction	100%	75%	82%	75%	82%	75%	82%
Production de pâte à dissoudre (kT/an)	300 (pâte à papier)	209	229	300	300	263	263
Production éthanol (m^3/an)	-	35 409	35 409	50 680	46 401	44 471	40 611
Coûts production éthanol ($/T pâte à dissoudre)	-	119	109	119	109	119	109
Bénéfices éthanol ($/T pâte à dissoudre)	-	98	90	98	90	98	90
Bénéfices pâte à dissoudre ($/T pâte à dissoudre		127	127	127	127	127	127
Bénéfices globaux ($/T de pâte à dissoudre)	-	106	108	106	108	106	108
Bénéfices annuels sur pâte (k$/an)	-	26 611	29 088	38 119	38 119	33 404	33 404
Bénéfices annuels sur éthanol (k$/an)	-	21 608	21 608	30 927	28 316	27 138	24 783
Dépenses annuelles production éthanol ($/an)	-	24 928	22 805	24 908	22 805	24 941	22 777
Bénéfices annuels (k$/an)	-	23 291	27 891	44 138	43 629	35 600	35 410

Tableau 48 : Bilan économique d'une usine kraft se convertissant pour produire de la pâte à dissoudre et de l'éthanol selon plusieurs scénarios (cf. tableau 46) et dans le cas où la différence de prix entre pâte kraft et pâte à dissoudre est de 127 $/T

	Référence	Conso. bois constante		Prod. pâte constante		Utilisation chaudière 100%	
Rendement extraction	100%	75%	82%	75%	82%	75%	82%
Production de pâte à dissoudre (kT/an)	300 (pâte à papier)	209	229	300	300	263	263
Production éthanol (m^3/an)	-	35 409	35 409	50 680	46 401	44 471	40 611
Coûts production éthanol ($/T pâte à dissoudre)	-	119	109	119	109	119	109
Bénéfices éthanol ($/T pâte à dissoudre)	-	98	90	98	90	98	90
Bénéfices pâte à dissoudre ($/T pâte à dissoudre		355	355	355	355	355	355
Bénéfices globaux ($/T de pâte à dissoudre)	-	334	336	334	336	334	336
Bénéfices annuels sur pâte (k$/an)	-	74 349	81 270	106 499	106 499	93 326	93 326
Bénéfices annuels sur éthanol (k$/an)	-	21 608	21 608	30 927	28 316	27 138	24 783
Dépenses annuelles production éthanol ($/an)	-	24 928	22 805	24 908	22 805	24 941	22 777
Bénéfices annuels (k$/an)	-	71 029	80 073	112 518	112 010	95 523	95 332

Tableau 49 : Bilan économique d'une usine kraft se convertissant pour produire de la pâte à dissoudre et de l'éthanol selon plusieurs scénarios (cf. tableau 46) et dans le cas où la différence de prix entre pâte kraft et pâte à dissoudre est de 355 $/T

5 Conclusion du chapitre

Trois études ont été présentées. Elles sont fondamentalement différentes, que ce soit le procédé d'extraction, les procédés secondaires, les sous-produits valorisés ou les facteurs de l'analyse économique. Il n'en a pas été fait mention jusqu'ici, mais le résultat économique dépend également de la valorisation des drêches (produit obtenus en bas de colonne de distillation) : nourriture animale, simple combustion ou épandage. Le but n'était donc pas de comparer directement ces études, mais de démontrer que l'implémentation de ces procédés dans une usine kraft n'est pas utopique mais économiquement envisageable.

Les procédés alcalins ont l'avantage de peu perturber les flux dans l'usine : la consommation en bois et la production de pâte restent quasiment inchangées. La production d'éthanol, quoi que modérée par rapport aux autres traitements, ne se fait donc pas au détriment de la production de pâte. Ceci est du reste l'un des inconvénients principaux de l'hydrolyse acide, qui perturbe les flux lors de la cuisson kraft. La production de pâte diminue si la consommation de bois reste identique, et maintenir une production de pâte constante provoque une augmentation de la quantité de matière organique envoyée à la chaudière de régénération. Or la chaudière est souvent le facteur limitant la production d'une usine kraft, et augmenter sa capacité demande de grands investissements. Il faut noter qu'il existe des solutions alternatives pour traiter ce surplus de matière organique qui trouveraient parfaitement leur place dans le cadre d'une bioraffinerie. Par exemple, la gazéification de la liqueur noire permettrait de produire d'autres sous-produits dans la bioraffinerie ([19], cf. chapitre I, partie B.1.1), tout comme la précipitation de la lignine (procédé lignoboost). Dans ce dernier cas, la liqueur noire est acidifiée avec du dioxyde de carbone (sous-produit de la fermentation) et filtrée pour être valorisée [184].

De manière plus générale, pour tous ces procédés les hydrolysats traversent des *flash tank*, procédé simple permettant de les concentrer et de les détoxifier en partie. Les hydrolysats ne subissent en général pas d'autres étapes de concentration avant la fermentation. Néanmoins, le coût énergétique de la distillation reste inférieur à celui de l'extraction, ce qui indique qu'il n'est pas absolument indispensable de fortement concentrer les hydrolysats. L'inhibition de la fermentation peut donc rester limitée. Ainsi, contrairement aux procédés alcalins et l'hydrolyse acide, et à la lumière des résultats obtenus dans le chapitre II, l'ajout d'un procédé de détoxification après une autohydrolyse ne semble pas indispensable.

Pour terminer, la valorisation de la cellulose sous forme de fibres reste le cœur de métier de la bioraffinerie. En extraire une partie, même transformée en éthanol, a un impact négatif économique non négligeable. Par ailleurs, l'extraction des hémicellulose devrait permettre aux bioraffinerie de produire de la pâte à dissoudre au lieu de pâte à papier. La plus haute valeur ajoutée de la pâte à dissoudre permettrait d'augmenter considérablement les entrées d'argent, même si la production d'éthanol en elle-même ne serait pas rentable.

Conclusion générale

Ces travaux ont permis de développer un procédé rendant possible de produire de la pâte à papier et de l'éthanol simultanément dans une usine kraft. Une étude complète, à partir d'une même matière première, et en gardant à l'esprit la faisabilité économique a été réalisée. Cette étude inclut les différentes stratégies d'extraction des hémicelluloses et la fermentation des hydrolysats les plus prometteurs en éthanol.

La première partie était dédiée à l'étude des différentes méthodes d'extraire les hémicelluloses. Différents prétraitement, dont les paramètres ont été sélectionnés dans la littérature selon leur efficacité, ont été appliqués à des copeaux de bois. Les traitements alcalins se sont révélés décevants. La concentration maximale en hexoses dans les hydrolysats a été mesurée à 1,22 g/L (2,19 g/L de saccharides au total). L'extraction des hémicelluloses s'est avérée très faible, et le peeling qui sévit dans ces conditions en a dégradé une partie sous forme d'acides organiques. De plus, les hémicelluloses ayant réchappé au peeling étaient exclusivement sous forme d'oligomères et une hydrolyse secondaire aurait donc été nécessaire avant leur fermentation. L'extraction en milieu quasi-neutre, débutant en milieu faiblement alcalin et se terminant en milieu légèrement acide, a abouti aux mêmes conclusions, même s'il a permis une extraction un peu plus importante d'hémicelluloses. Des concentrations en hexoses situées entre 2,0 et 2,7 g/L ont ainsi été mesurées (entre 2,7 et 3,0 g/L de saccharides au total). Les prétraitements effectués en milieu acide se sont révélés plus encourageants. L'autohydrolyse a permis d'obtenir 23,5 g/L d'hexoses en solution (30,1 g/L de saccharides au total) tout en limitant l'apparition de HMF, furfural, acide acétique et acide formique. Cependant, l'ensemble des hémicelluloses n'a pas totalement été extrait. En effet, seuls 55 à 58% des GGM présents initialement dans le bois ont été solubilisés. De plus, le taux de monomère des hexoses, ne dépassant pas 61%, rend indispensable un traitement secondaire permettant la dépolymérisation des oligomères. *A contrario*, une hydrolyse secondaire n'est pas absolument nécessaire suite à une hydrolyse acide. Celle-ci a en effet permis d'atteindre un taux de monomère de 89% pour les hexoses, et une concentration dans l'hydrolysat de 33,9 g/L, soit une extraction des GGM supérieure à 86% (une concentration de 44,9 g/L de saccharides au total a été obtenue). Cependant, la dégradation des saccharides extraits a été plus importante. Les concentrations en HMF, furfural et acide formique mesurées dans l'hydrolysat sont multipliées par au moins 6 par rapport à ces mêmes concentrations mesurées suite à une autohydrolyse. De l'acide lévulinique est également apparu. De plus, l'utilisation d'acide pendant le prétraitement peut nuire aux propriétés des fibres destinées à la production de pâte, et donc diminuer les caractéristiques de la cellulose et du papier.
Une optimisation de l'hydrolyse secondaire suivant l'autohydrolyse a été menée afin de dépolymériser l'ensemble des oligomères tout en limitant la dégradation des saccharides obtenus. Les concentrations en espèces inhibitrices restent ainsi au minimum deux fois plus faibles que celles mesurées suite à une hydrolyse acide. Des essais exploratoires d'hydrolyses secondaires enzymatiques ont été effectués suite à des autohydrolyses pour servir d'alternatives aux hydrolyses secondaires acides. Effectuée sur des oligomères solubilisés et donc facilement accessibles, l'utilisation d'enzymes aurait pu s'avérer très efficace en aboutissant à une dépolymérisation des oligomères sans aucune dégradation des saccharides. Néanmoins, les essais effectués ne se sont pas révélés satisfaisants au regard des quantités de monomères obtenues. Il s'est avéré que le mélange d'enzymes utilisé ne contenait pas l'ensemble des hémicellulases nécessaire à l'hydrolyse complète des GGM.

Les deux traitements acides, à savoir l'hydrolyse acide et le traitement en deux étapes constitué d'une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire, ont été sélectionnés afin de servir de référence pour les chapitres suivants. Si le procédé était mené à son terme, les productions d'éthanol s'élèveraient à 2,5 g pour 100 g de bois suite à une autohydrolyse, et à 3,6 g pour 100 g de bois suite à une hydrolyse acide.
Par ailleurs, dans le but de concentrer les hydrolysats, trois procédés ont été étudiés sur des autohydrolyses : l'évaporation de l'hydrolysat, la diminution du ratio L/B et le recyclage de l'hydrolysat lors du prétraitement. L'évaporation est coûteuse en énergie, mais a eu le double avantage de concentrer l'hydrolysat en saccharides mais aussi d'en retirer une partie des inhibiteurs, à savoir l'acide acétique, l'acide formique et le furfural. Les acides organiques étant les inhibiteurs les plus nuisibles, l'ajout d'un stade d'évaporation peut donc s'avérer particulièrement pertinent. La diminution du ratio L/B a permis de concentrer un hydrolysat sans observer de dégradation plus importante des saccharides. Néanmoins, dans ce cas, la quantité d'hémicelluloses effectivement extraites diminue sensiblement puisqu'une part plus importante de sucres solubilisés reste piégée dans les copeaux de bois. Le recyclage de l'hydrolysat a également permis d'en augmenter la teneur en saccharides, cependant la proportion de saccharides dégradés en furanes, et donc le pouvoir inhibant de l'hydrolysat, augmente avec le taux de recyclage. Ces trois procédés, présentant chacun des avantages et des inconvénients, doivent donc être utilisés judicieusement.

La partie suivante était consacrée à l'étude de la fermentation des hydrolysats à l'aide d'une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation directe de ces hydrolysats pendant 24 heures a donné d'excellents résultats. L'hydrolysat obtenu après une autohydrolyse suivie d'une hydrolyse secondaire a permis de transformer 73% des hexoses en éthanol. Ce chiffre a atteint 73 à 78% avec un hydrolysat résultant d'une hydrolyse acide. Parmi les hexoses, le galactose a été particulièrement récalcitrant à la fermentation, ce qui était attendu. Calculés uniquement sur les hexoses consommés, les rendements de fermentations ont ainsi atteint 90%. Il peut se révéler cependant indispensable de concentrer les hydrolysats avant la fermentation afin de réduire les investissements à effectuer et les coûts de la distillation. Dans cette hypothèse, les milieux de fermentation contiendraient des concentrations plus importantes en inhibiteurs. Des hydrolysats ainsi concentrés ont été soumis à des fermentations. Les levures, inhibées, n'ont pas permis la moindre production d'éthanol. L'impact de chaque inhibiteur a alors été étudié individuellement aux concentrations rencontrées dans les hydrolysats concentrés. Les furanes n'ont pas eu d'impact notable sur la fermentation, contrairement aux lignosulfonates. Ceux-ci, utilisés pour simuler la présence de composés dérivant de la lignine, ont entrainé une baisse significative des rendements de fermentation, sans toutefois inhiber totalement les levures. Il est néanmoins difficile d'évaluer si ces lignosulfonates ont un effet identique aux composés dérivés de la lignine présents dans les hydrolysats. Les acides organiques se sont révélés quant à eux beaucoup plus problématiques. Plus le pKa de l'acide est bas, plus il est inhibiteur. L'acide lévulinique, au pKa relativement élevé et présent en faibles concentrations, n'a pas d'effet notable. L'acide formique est quant à lui doté d'un pKa plus faible. Les levures ont été en partie inhibées en sa présence, malgré des concentrations là aussi relativement basses. Cela s'est traduit par une productivité en éthanol des levures réduite, même si d'excellents rendements de fermentation ont pu être obtenus après 48 heures. L'acide acétique, au pKa similaire à celui de l'acide lévulinique, a inhibé les levures du fait de ses concentrations élevées. L'efficacité des levures diminue au fur et à mesure que la concentration en acide acétique augmente. De plus, les levures ont semblé complètement inhibées pour des concentrations supérieures à 7 g/L. Or, des concentrations de plus de 10 g/L peuvent être

atteintes dans les hydrolysats concentrés, ce qui explique que les levures étaient totalement inhibées dans ce type de milieu de fermentation.
Dans le but de pouvoir malgré tout fermenter des hydrolysats concentrés, différentes souches de *S. cerevisiae* ont été adaptées à un hydrolysat concentré : la proportion d'inhibiteurs dans leur milieu de culture a été augmentée progressivement. La meilleure des souches a ainsi permis de fermenter un hydrolysat contenant 75 g/L d'hexoses, et notamment plus de 8 g/L d'acide acétique. Plus de 72 heures lui ont cependant été nécessaires, avec un rendement sur les hexoses consommés de 89%. Même si la fermentation d'un hydrolysat concentré à 100 g/L d'hexoses n'a pas été possible, cela prouve que la fermentation d'un hydrolysat relativement concentré sans stade de détoxification préalable est possible.

La troisième partie était constituée d'une étude technico-économique des procédés décrits dans les chapitres précédents. Celle-ci a montré que la production d'éthanol dans une usine kraft n'est pas une utopie. De plus, le procédé privilégié dans cette thèse, à savoir l'autohydrolyse suivie d'une hydrolyse acide, présente certains avantages, notamment par rapport aux prétraitements par hydrolyse acide. Il est ainsi possible de se passer de stade de détoxification coûteux. Par ailleurs, l'autohydrolyse a l'avantage de minimiser la dégradation de la cellulose. Des calculs économiques ont démontré que la production d'éthanol et de pâte à papier n'est pas encore rentable. Cependant, l'extraction des hémicelluloses peut permettre à l'usine de produire de la pâte à dissoudre, produit à plus forte valeur ajoutée. Dans ce cas, le procédé global permet d'améliorer significativement le bilan financier de l'usine. Cette dernière produirait alors deux produits d'avenir, de l'éthanol comme biocarburant et de la pâte à dissoudre dont la production est amenée à croître dans le futur, notamment pour répondre à la demande en fibres textiles.

Pour conclure, cette étude a permis d'explorer la majorité des possibilités amenant à la production d'éthanol hémicellulosique dans une usine kraft, du copeau de bois jusqu'à l'éthanol. En plus d'être une étude globale, chaque partie peut servir de base à des travaux ultérieurs. Ainsi, la partie dédiée à l'extraction des hémicelluloses peut être exploitée quelle que soit la finalité de ces hémicelluloses. Celles-ci peuvent ainsi être utilisées pour fabriquer de l'éthanol, mais également pour la production de matériaux ou de molécules prometteuses comme les furanes ou l'acide lévulinique (cf. chapitre I). De même, la partie sur la fermentation peut être utilisée comme base de travail pour la production d'éthanol de seconde génération à partir d'hémicelluloses, mais d'autres fermentations peuvent aussi être envisagées, pour la production d'autres alcools ou d'autres molécules (butanol, acide lactique…). La fermentation peut également être vue comme un moyen de purifier un hydrolysat de ses sucres, en les transformant en éthanol. Ethanol qui sera ensuite éliminé par distillation.

Il est possible de compléter le travail présenté ici. La fermentation peut encore être optimisée. L'acclimatation de souches de levures effectuée dans cette étude est un procédé efficace mais qui a ses limites. Le développement et l'utilisation de souches génétiquement modifiées, très tolérantes aux inhibiteurs, pourrait permettre d'améliorer les rendements de fermentation ou la productivité. Il serait de plus possible de fermenter les pentoses, en plus des hexoses, soit en utilisant un microorganisme capable de fermenter les deux types de saccharides, soit en utilisant deux microorganismes.
L'effet des procédés de détoxification sur les fermentations pourrait également être étudié. La fermentation d'un hydrolysat ayant subi une évaporation pourrait par exemple s'avérer très instructive. Il serait intéressant de savoir dans quelles mesures l'inhibition de l'hydrolysat concentré serait réduite après la perte d'inhibiteurs dans les vapeurs.
L'hydrolyse secondaire enzymatique mériterait également une étude approfondie. L'utilisation d'un cocktail d'enzymes adapté aux oligomères présents dans l'hydrolysat pourrait permettre

d’atteindre une dépolymérisation totale. Cela éviterait non seulement de dégrader les sucres, mais aussi de limiter l’utilisation de produits chimiques. Contrairement à l’hydrolyse acide, l’hydrolyse secondaire est effectuée à des pH plus proches des pH optimaux aux fermentations, et nécessite donc moins de produits pour corriger ce pH.
Enfin, il serait intéressant de mener le procédé jusqu’au bout, c’est-à-dire jusqu’à la production d’éthanol pur, après distillation, et de cellulose, à l’échelle pilote. Il serait alors possible d’effectuer une étude technico-économique complète, prenant en compte les différents scénarios étudiés. Cela permettrait par exemple de déterminer la concentration minimale en sucres fermentescibles indispensable avant la fermentation, de déterminer si une étape d’évaporation est justifiée ou encore de savoir si la récupération des sucres solubilisés piégés dans les copeaux est envisageable. Cette étude permettrait donc d’évaluer le procédé qui semble le plus prometteur. Des essais à plus grande échelle pourraient alors être envisagés, et pourquoi ne pas imaginer dans l’avenir une usine kraft se lançant dans la production d’éthanol à partir d’hémicelluloses…

Chapitre V : Matériels et méthodes

A. Matière première et réactifs

1 Bois utilisé

Le bois utilisé dans cette thèse provient directement de l'usine de pâte Fibre Excellence située à Tarascon, sous forme de copeaux de taille hétérogène que l'on utilise typiquement pour la fabrication de pâte à papier. Les copeaux sont composés d'un mélange de résineux, dont la composition moyenne est la suivante : 35% de pin sylvestre, 24% de pin noir, 18% de pin d'Alep, 16% d'épicéa et 7% de sapin de Douglas. La siccité moyenne des copeaux, mesurée à leur arrivée, était de 55%. Les copeaux ont été conditionnées en sac de 2 kg et congelés jusqu'à utilisation.

2 Produits utilisés

Les produits suivants ont été utilisés.

Pour l'extraction des hémicelluloses :

- Acide chlorhydrique 96% Acros Organics
- Acide sulfurique 96% Acros Organics
- Carbonate de sodium 99,5% Roth
- Hydroxyde de sodium 97% Roth
- Sulfate de sodium 99% Roth
- Sulfure de sodium 60% Roth

Pour les fermentations :

- 5-hydroxyméthylfurfural, 99% Sigma-Aldrich
- Acide acétique 99%, Roth
- Acide formique 95—97%, Aldrich
- Acide lévulinique 98% Sigma Aldrich
- Furfural (2-furaldéhyde) 99% Acros Organics
- Lignosulfonates Tembec (Tartas)
- Sulfate d'ammonium 99,5% Prolabo
- Sulfate de magnésium 99,5% Janssen Chimica
- Levures *Saccharomyces cerevisiae* 90% actives (Sigma Aldrich)
- Levures *Saccharomyces cerevisiae* CQLA 1900-1, 10.386, INT-005 et INT-041, fournies par la *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*
- Milieu de fermentation YPD (*Yeast Extract*, Peptone, Dextrose), contenant 40% de peptone, 20% d'extrait de levure et 40% de glucose (Sigma Aldrich)

- Milieu de culture YPD avec agar contenant 25% d'agar, 30% de peptone, 15% d'extrait de levure et 30% de glucose (Sigma Aldrich)
- Milieu de fermentation YNB (*Yeast Nitrogen Base*) avec acides aminés. Une solution à 6,7 g/L contient 1 g/L de KH_2PO_4, 5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g/L de $MgSO_4$, 0,1 g/L de NaCl, 0,1 g/l de $CaCl_2$, 10 mg/L d'Histidine HCl, 20 mg/L de Methionine, 20 mg/L de Tryptophan, 2 mg/L d'Inositol ainsi que des vitamines (<1 mg/L) (Sigma Aldrich)

Autre utilisations :

▪ Azote		Air Liquide
▪ D (-)-arabinose	99%	Sigma Aldrich
▪ D (+)-galactose	98%	Acros Organics
▪ D (+)-glucose	99,5%	Roth
▪ D (+)-mannose	99%	Acros Organics
▪ D (+)-xylose	99%	Roth
▪ Ethanol	99%	Fisher Scientific
▪ Glycérol	99,5%	Roth
▪ L(-)-fucose	95%	Roth
▪ Celluclast de *Trichoderma reesei* ATCC 26921		Sigma Aldrich
▪ Mannanase Mannaway		Novozymes

B. Extraction des hémicelluloses

1 Réacteurs utilisés

Deux réacteurs ont été utilisés pour extraire les hémicelluloses

1.1 Multi-obus ERTAM

Le multi-obus ERTAM a été utilisé pour l'ensemble des extractions des hémicelluloses sur des copeaux effectuées pendant cette thèse.
Il est composé de six obus en acier inoxydable d'une capacité de 3,3 litres chacun placés dans un bain d'huile. Pendant les extractions, le tout est en rotation. Un logiciel permet de réguler le bain d'huile en température. Il permet de paramétrer les durées des montée et descente en températures ainsi que des paliers, dans les limites des possibilités de l'appareil.
Jusqu'à six expériences peuvent être réalisées simultanément. Cependant, dans ce cas, les profils de températures utilisés ne peuvent pas varier.

1.2 Mini multi-obus

L'autre réacteur utilisé est constitué d'obus en acier inoxydable de 100 mL de volume. Il est possible de placer 11 obus simultanément dans l'appareil. Un douzième emplacement existe et est occupé par la sonde de température. L'appareil peut être mis en agitation et est régulé en température. Une résistance électrique permet de chauffer l'appareil. La régulation est moins perfectionnée que pour le multi-obus ERTAM. Il est impossible de choisir les gradients de montée et descente en température. Il est seulement possible de déterminer la température finale. L'appareil chauffe alors au maximum jusqu'à atteindre cette température.

Cet appareil n'a pas été utilisé pour les extractions car il était impossible de paramétrer la durée de montée en température, mais également à cause du petit volume des réacteurs. En effet, la quantité de copeaux pouvant y être introduite est trop faible pour être représentative, étant donné leur hétérogénéité.
Ces réacteurs se sont toutefois révélés pratiques pour effectuer les hydrolyses secondaires. Le volume des réacteurs se révèle même un avantage, permettant de réaliser des expériences sur de petites quantités. De plus, contrairement au multi-obus ERTAM, il est possible de placer ou prélever des obus pendant l'expérience, et donc d'effectuer des cinétiques.

2 Extractions

Les copeaux utilisés sont décongelés environ 24 heures avant l'extraction. La siccité du lot de copeaux est alors mesurée sur environ 100 g, en les plaçant 24 heures dans une étuve régulée à 105°C.
A partir de cette siccité, la masse de copeaux et de liqueur à introduire dans l'obus est déterminée. La liqueur peut être composée d'eau distillée seule (autohydrolyse), ou contenir un acide ou une liqueur alcaline selon le cas. Les copeaux et la liqueur sont introduits dans l'obus, dont on inerte l'espace de tête en y injectant de l'azote pendant une trentaine de secondes avant de sceller l'obus.
L'extraction se déroule alors suivant le profil de température demandé. Le contenu de l'obus est ensuite filtré. Le volume d'hydrolysat récupéré est mesuré avant d'être mis en bouteille. Celle-ci est placée au réfrigérateur pour un stockage de quelques jours, ou au congélateur pour une conservation plus longue.
En parallèle, les copeaux sont lavés : ils sont placés 24 heures dans un grand volume d'eau dans lequel l'hydrolysat contenu dans les copeaux peut diffuser. L'eau est changée deux fois durant ces 24 heures.

Les paramètres des différentes extractions menées durant cette thèse (cf. chapitre II, partie B) sont résumés dans le Tableau 50. Les NNE sont effectuées avec de la liqueur verte diluée, dont la composition est donnée dans le Tableau 51.

	Température (°C)	Durée (min)[1]	H_2SO_4 (%/bois)	L/B
Autohydrolyse 160	160	90-120-30	-	4
Autohydrolyse 170	170	30-65-30	-	2 ; 2,5 ; 3 et 4
Hydrolyse acide	160	90-120-30	H_2SO_4 (1%)	4
CCE 1	30	0-30-0	NaOH (75%)	4
CCE 2	30	0-240-0	NaOH (75%)	4
CCE 3	30	0-30-0	NaOH (33,3%)	4
Extraction alcaline	90	10-230	NaOH (33,3%)	4
NNE	160	10-110-15	LV[2] (3%)	4

Tableau 50 : Paramètres des extractions effectuées ; [1]durée de montée en température-durée à température-durée de descente en température [2]Liqueur verte diluée

Composition	
NaOH	0,25 g/L
Na_2S	0,26 g/L
Na_2CO_3	1,92 g/L
Na_2SO_4	0,01 g/L

Tableau 51 : Composition de la liqueur utilisée pour les NNE (liqueur verte diluée)

Rendement d'extraction
Lors de nos extractions, les copeaux n'étaient pas destinés à des usages ultérieurs La mesure de la quantité de matériau extraite pouvait donc être effectuée sur l'ensemble de ces copeaux.
Après leur lavage, ceux-ci ne contiennent plus d'hydrolysat. Ils sont placés 24 heures dans une étuve à 105°C, avant d'être pesés. La différence de masse avec les copeaux introduits initialement permet de quantifier la quantité de matière extraite.

3 Hydrolyses secondaires

3.1 Hydrolyses acides

Un grand nombre d'hydrolyses secondaires acides ont été effectuées. Les paramètres utilisés pour les essais exploratoires sont résumés dans le Tableau 52, ceux concernant l'optimisation dans le Tableau 53. Pour l'ensemble de ces essais, le mini multi obus a été utilisé.
Pour les essais ne contenant pas d'acide, 25 mL d'hydrolysat y sont introduits. L'espace de tête est ensuite inerté avec de l'azote avant de fermer hermétiquement les obus.
Pour les essais requérant de l'acide sulfurique, 25 mL d'hydrolysat et 1 mL d'un mélange acide sulfurique à 96% (w/w) et d'eau distillée sont introduits dans l'obus La proportion d'acide varie selon la concentration souhaitée. Cela permet d'avoir une même dilution sur l'ensemble des essais. L'espace de tête est ensuite inerté à l'azote, puis l'obus est fermé. Les quantités mesurées dans l'hydrolysat seront ensuite multipliées par le ratio $\frac{26}{25}$ pour corriger la dilution.
Pour l'unique campagne d'essai nécessitant un temps de montée en température fixé, l'obus a été placé dans l'appareil peu de temps après son démarrage. Il a alors fallu 23 min pour atteindre 160°C.
Pour les autres campagnes d'essais, les obus ont été introduits dans une fois à température.

A la fin de chaque hydrolyse, les obus sont plongés directement dans de l'eau froide pour stopper toute réaction. Leur contenu est ensuite placé au réfrigérateur pour un stockage de quelques jours, ou au congélateur pour une conservation plus longue.

Température	Durée montée en température	Durée à température	Concentration H_2SO_4
120°C	0 min	1 à 6 h	0
160°C	23 min	60 à 210 min	0
190°C	0 min	5 à 40 min	0
160°C	0 min	1 à 4 h	0,5% (w/w)
120°C	0 min	60 min	0 à 6% (w/w)

Tableau 52 : Paramètres des différentes campagnes d'essais exploratoires pour les hydrolyses secondaires

N° essai	Durée	Température	% H_2SO_4
1	30 min	100°C	0,5%
2	30 min	100°C	4%
3	90 min	100°C	0,5%
4	90 min	100°C	4%
5	30 min	140°C	0,5%
6	30 min	140°C	4%
7	90 min	140°C	0,5%
8	90 min	140°C	4%
9 ; 10 et 11	60 min	120°C	2,25%

Tableau 53 : Paramètres utilisés lors du plan d'expérience concernant l'hydrolyse secondaire

3.2 Hydrolyses enzymatiques

Deux solutions commerciales d'enzymes ont été utilisées pour effectuer les hydrolyses enzymatiques : Mannaway (Novozyme) et Celluclast (Sigma Aldrich). Les hydrolyses effectuées avec une seule enzyme ont été menées sur un hydrolysat tamponné au pH optimal pour l'enzyme. Les hydrolysats utilisant deux enzymes en série n'ont pas été tamponnés, afin de pouvoir modifier le pH entre les deux hydrolyses.

3.2.1 Hydrolyses menées avec une seule enzyme

Mannaway est une mannanase utilisée dans l'industrie de la pâte cellulosique. Elle est appliquée à raison de 0,1 à 0,5 kg de solution par tonne de biomasse. Pour ces essais exploratoires, les enzymes ont été surdosées pour atteindre 35 kg par tonne de biomasse (soit 35 mg par g). La biomasse prise en compte ici est l'ensemble des oligomères solubilisés dans l'hydrolysat.
Le pH de l'hydrolysat est tout d'abord corrigé à 8,0, pH optimal de la Mannaway, en utilisant une solution de soude (1 mol/L), puis tamponné en utilisant une solution composée de K_2HPO_4 (0,079 mol/L) et KH_2PO_4 (0,0045 mol/L) : 0,5 mL de tampon sont ajoutés à 5 mL d'hydrolysat à pH 8, ainsi que 0,5 mL d'une solution de Mannaway afin d'obtenir 35 mg de solution par gramme d'oligomères.
L'hydrolyse est effectuée pendant 48 heures à 50°C, avec des prélèvements après 4h et 24h d'hydrolyse.

La Celluclast est une solution comprenant plusieurs enzymes dont l'activité est supérieure ou égale à 700 U/g. Le pH de l'hydrolysat est corrigé à 5,5, pH optimal de la Celluclast, avec une solution de soude (1 mol/L) puis tamponné en utilisant une solution composée de K_2HPO_4 (0,045 mol/L) et de citrate (0,0018 mol/L) : 0,5 mL de ce tampon sont ajoutés à 5 mL d'hydrolysat, ainsi que 0,5 mL d'une solution de Celluclast afin d'obtenir une activité de 30 U/g d'oligomères.
L'hydrolyse est effectuée pendant 48 heures à 50°C, avec des prélèvements après 4h et 24h d'hydrolyse.

3.2.2 Hydrolyses menées avec les deux enzymes

Des hydrolyses ont été menées avec les deux enzymes successivement. Le pH de l'hydrolysat est tout d'abord été corrigé avec une solution de soude (1 mol/L) pour atteindre le pH optimal de la première enzyme. Celle-ci est ajoutée puis l'hydrolyse menée à la température optimale

correspondante. Après 24h, le pH est de nouveau corrigé avec la solution de soude ou une solution de citrate (20 g/L) avant d'ajouter la seconde enzyme et laisser de nouveau 24h à la température optimale de cette seconde enzyme. Des prélèvements sont effectués après 4h, 24h, 28h et 48h. Les quantités d'enzymes par rapport aux oligomères sont identiques à celles utilisées lors des hydrolyses précédentes.

Une hydrolyse a également été effectuée avec les deux enzymes simultanément. Le pH de l'hydrolysat est fixé à 6,5 avec une solution de soude (1 mol/L) puis tamponné avec une solution de K_2HPO_4 (0,011 mol/L) et KH_2PO_4 (0,029 mol/L). Les enzymes sont ajoutées pour atteindre les mêmes quantités que précédemment par rapport à la concentration en oligomères. L'hydrolyse est menée pendant 72 heures à 50°C, avec des prélèvements après 4h, 24h et 48h.

4 Calcul des teneurs en hexoses et pentoses extraits

Les résultats d'hexoses et pentoses extraits lors des procédés d'extraction sont calculés à partir des concentrations en saccharides présents dans les hydrolysats, mais également à partir des concentrations en HMF, furfural, acide formique et acide lévulinique.
Il est considéré qu'une mole d'hexose se dégrade en une mole de HMF, elle-même donnant une mole d'acide lévulinique et une mole d'acide formique (voir les mécanismes de formation [3], [185]).
De même, il est considéré qu'une mole de pentose se dégrade en une mole de furfural, elle-même donnant une mole d'acide formique [3].
Les deux types de saccharide peuvent donc former de l'acide formique. Il est alors considéré que la quantité d'acide formique à attribuer aux hexoses est la même que celle d'acide lévulinique (en moles), le reste provenant de la dégradation du furfural.
Le calcul des quantités extraites s'effectuant sur l'ensemble des saccharides (monomères et oligomères), ce sont les concentrations en saccharides et en produits de dégradation mesurées après les hydrolyses secondaires qui sont utilisées dans ces calculs.
Ainsi, les Equations 21 et 22 ont été utilisées pour calculer les concentrations en hexoses et pentoses extraits. Elles ont été déterminées grâce aux masses molaires des différents composés, rappelées dans le Tableau 54.
Les saccharides extraits sont encore sous-évalués avec cette méthode, étant donné qu'il existe d'autres produits de dégradation, et que le furfural et le HMF peuvent polymériser entre eux [3]. Or ces polymères ne sont pas comptabilisés.

Equation 21

$$C_{C6\ extraits} = C_{C6} + \frac{180,2}{126,1} C_{HMF} + \frac{180,2}{116,1} C_{Acide\ lévulinique}$$

Concentrations en g/L dans les hydrolysats

Equation 22

$$C_{C5\ extrais} = C_{C5} + \frac{150,1}{96,1} C_{furfural} + \frac{150,1}{46} (C_{Acide\ formique} - \frac{46}{116,1} C_{Acide\ lévulinque})$$

Concentrations en g/L dans les hydrolysats

	Masse molaire (g/mol)
Hexoses	180,2
Pentoses	150,1
HMF	126,1
Furfural	96,1
Acide Formique	46,0
Acide Lévulinique	116,1

Tableau 54 : Masses molaires des hexoses, pentoses, et produits de dégradation

5 Evaporation de l'hydrolysat

Certains hydrolysats ont été concentrés par évaporation en vue de les fermenter. Ces évaporations ont été effectuées à 70°C sous une pression de 35 kPa dans un rotavapeur jusqu'à évaporation du volume voulu.

C. Fermentation

1 Fermentations d'hydrolysats et étude des inhibiteurs

Les fermentations sont effectuées dans des flacons en verre de 100 mL. L'ensemble du matériel non stérile utilisé est tout d'abord stérilisé à la vapeur par autoclave (15 min à 120 °C).
Vingt millilitres de solution à fermenter (hydrolysat ou solution synthétique) sont introduits dans le flacon. Cinq millilitres d'une solution de sulfate d'ammonium à 10 g/L et de sulfate de magnésium à 2 g/L sont ajoutés, comme source azotée. Le pH est alors ajusté à 4,5 à l'aide d'une solution de soude (20 g/L) ou d'acide sulfurique (20 g/L). Trois grammes de levures *S. cerevisiae* Sigma Aldrich, sèches, sont ajoutés pour obtenir une concentration en levures d'environ 10 g/L.
Le flacon est ensuite fermé hermétiquement avec un bouchon muni d'un septum et placé sous agitation dans une étuve régulée à 30°C. Si nécessaire, des prélèvements sont effectués à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stérile à travers le septum. Le milieu de fermentation est alors filtré directement à l'aide d'un filtre seringue (membrane en nylon de porosité 0,45 µm) et congelé s'il n'est pas analysé directement.

Les levures Sigma Aldrich utilisées ne sont pas livrées pures, mais sur un substrat. Or, une partie de celui-ci peut être fermenté. Pour évaluer l'éthanol produit provenant de ce substrat, et non du milieu de fermentation, des blancs sont effectués. Il s'agit de fermentations similaires aux précédentes, si ce n'est que le milieu de fermentation est composé uniquement d'eau distillée. Les quantités d'éthanol mesurées dans ces blancs sont alors retranchées aux mesures effectuées sur les autres fermentations.

2 Acclimatation des levures à un hydrolysat concentré

2.1 Constitution des milieux de culture

En plus de la souche de levure fournie par Sigma Aldrich, quatre autres souches ont été utilisées pour ces expériences. Ces souches ont été reçues sous forme de poudre sèche d'Equateur. Les cinq souches ont tout d'abord été mises en solution dans de l'eau distillée stérilisée, puis directement transférées dans des boites de Petri préalablement remplies d'un milieu composé de YPD et d'agar stérile.
Les boites de Petri sont placées plusieurs jours dans un étuve régulée à 30 °C.

2.2 Solutions utilisées pour l'acclimatation

L'objectif est d'acclimater les levures à un hydrolysat concentré (contenant environ 100 g/L d'hexoses) en augmentant petit à petit la proportion d'hydrolysat présente dans leur milieu de fermentation. Deux solutions ont été préparées, l'une contenant l'hydrolysat et l'autre étant un milieu de fermentation optimal pour les levures.

L'hydrolysat utilisé provient d'une autohydrolyse 170 (cf. Tableau 50 ci-dessus). Il est ensuite concentré par évaporation afin de multiplier par 4 sa concentration en hexoses, puis il subit une hydrolyse secondaire selon la référence (d'après [173]). De l'acide acétique et du furfural est perdu durant l'évaporation. L'objectif étant de fermenter un hydrolysat concentré contenant l'ensemble de ses inhibiteurs pour se placer dans le cas le plus défavorable, de l'acide acétique et du furfural est alors ajouté pour compenser les pertes. Afin de fermenter ce milieu, une source d'azote y est également ajoutée sous forme de YNB. Il est conseillé par le fournisseur d'en utiliser 6,7 g pour 5 g de sucres fermentescibles, c'est pourquoi une concentration finale en YNB de 134 g/L est visée, puisque l'hydrolysat contient environ 100 g/L d'hexoses. Cette solution est ensuite stérilisée par filtration (filtre de 0,45µm).

L'autre solution utilisée est une solution d'eau distillée stérilisée contenant 100 g/L de glucose et 134 g/L de YNB, Cette solution est de nouveau stérilisée par filtration.

Ainsi, tout mélange de ces deux solutions contient la même quantité de sucres fermentescibles et de YNB. Ceci permet de réduire le stress occasionné aux levures lors d'un passage d'une solution à l'autre pendant l'acclimatation.

2.3 Acclimatation

Avant toute chose, les levures sont cultivées pour produire de la biomasse : des colonies sont transférées de la boite de Petri dans 30 mL de YPD, milieu contenant à la fois une source de carbone et une source d'azote. Elles sont laissées plusieurs jours sous agitation à 30°C pour se multiplier.

Le contenu est ensuite transféré dans un tube de centrifugation de 10 mL. Les levures sont alors isolées : le tube est centrifugé (5 min à 3000 tr/min) et le surnageant est retiré. Les levures sont ensuite lavées avec de l'eau distillée stérilisée : 8 mL d'eau sont ajoutés, les levures sont mises en suspension puis le tube est de nouveau centrifugé et le surnageant retiré. Trois lavages successifs suivant sont effectués.
Ensuite commence l'adaptation proprement dite. Elle se déroulera en 4 étapes, avec des milieux de fermentation contenant successivement 0%, 25%, 50%, 75% et 100% d'hydrolysat. Deux séries d'essais ont été effectuées.

2.3.1 Première série d'essais

Le premier milieu de fermentation, composé de 4 mL de la solution de glucose et de YNB, est introduit dans un tube à centrifuger, ainsi que 0,4 mL de levures prélevées à la micropipette dans le milieu de culture. Le tube à centrifuger, fermé hermétiquement, est laissé 24h sous agitation dans une étuve à 30°C. Il est ensuite centrifugé et le surnageant est récupéré et congelé pour analyses.
La deuxième étape de l'acclimatation peut débuter. Comme précédemment, 0,4 mL de levures sont prélevés et transférés dans un nouveau tube à centrifuger contenant un milieu de fermentation contenant 25% d'hydrolysat, soit 1 mL de la solution d'hydrolysat et de YNB et 3 mL de la solution de glucose et YNB. Le tube à centrifuger, fermé hermétiquement, est laissé 24h sous agitation dans une étuve à 30°C. Il est ensuite centrifugé et le surnageant est récupéré et congelé pour analyses.
L'opération se répète pour des milieux de fermentation contenant successivement 50% ; 75% et 100% d'hydrolysat.

2.3.2 Deuxième série d'essais

Les résultats de la première série d'essais ne se sont pas révélés concluants. Il est possible que cela soit dû à la faible quantité de levures transférée entre chaque étape. Pour remédier à cela, c'est le milieu de fermentation qui sera transféré, et non les levures.

Après avoir cultivé les levures dans du YPD, celle-ci sont lavées trois fois (voir partie 2.3 ci-dessus). Après le dernier lavage, le tube est centrifugé et le surnageant est retiré. Il ne reste alors plus que les levures dans le tube. L'acclimatation peut commencer. Quatre millilitres de la solution composée de glucose et de YNB sont ajoutés dans le tube de centrifugation (étape à 0% d'hydrolysat). Le tube est placé 24 heures sous agitation dans une étuve régulée à 30°C. Le tube est ensuite centrifugé et le surnageant est récupéré et congelé pour analyses. Les levures sont lavées trois fois à l'eau distillée comme précédemment, avant d'y ajouter 4 mL du milieu de fermentation suivant (25% d'hydrolysat), pour une nouvelle fermentation de 24h.
Ce cycle est répété successivement en ajoutant des milieux contenant 50%, 75% et 100%. Les fermentations contenant 75% et 100% ont été laissées 72h à fermenter, et non 24h.

Des fermentation de contrôle consistant à fermenter des milieux contenant 50%, 75% et 100% d'hydrolysats avec les levures de départ non acclimatées ont été effectuées : des levures cultivées dans du YPD seul (milieu de culture) sont lavées trois fois comme ci-dessus. Après le dernier lavage, le tube est centrifugé et le surnageant est retiré. Le milieu de fermentation voulu est alors ajouté aux levures, puis la fermentation est effectuée pendant 24h à 30°C sous agitation.

D. Analyses

1 Teneur en saccharides

1.1 Analyse des monosaccharides

Les teneurs en arabinose, galactose, glucose, xylose et mannose dans les hydrolysats et les milieux de fermentation ont été mesurées par chromatographie haute performance d'échange d'anions à haute pression couplée à un détecteur à ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD, pour *High Performance Anion Exchange Chromatography – Pulsed Amperometric Detection*). Le système de chromatographie est un modèle Dionex ICS 5000, composé d'une colonne de garde (50 mm × 4 mm), d'une colonne CarboPac PA10 (250 mm × 4 mm) et d'un détecteur à ampérométrie pulsée composé d'une électrode de référence et d'une électrode d'or. Le tout est placé dans une enceinte thermostatée à 25°C. L'éluant est composé de potasse fournie par un générateur d'éluant placé entre la pompe et la colonne. Son débit est de 1 mL/min. La concentration de potasse est de 2 mmol/L pendant l'acquisition, qui dure 30 min. Ensuite, sa concentration est fixée à 100 mmol/L pendant 20 min afin de nettoyer la colonne entre deux analyses. Pour finir, la concentration passe de nouveau à 2 mmol/L pendant 15 min pour stabiliser la colonne avant l'analyse suivante. Le logiciel Chromeleon (Dionex) est utilisé pour exploiter les analyses.
Le volume d'injection est de 25 µL. Les concentrations maximales mesurables pour chaque monosaccharide sont de 40 mg/L, au-delà desquelles le détecteur sature. Une série de cinq standards est injectée en début de séquence. Une nouvelle série de standards est injectée après l'analyse de dix échantillons. Ces standards contiennent les cinq monosaccharides étudiés à des concentrations de 5, 10, 20, 30 et 40 mg/L.
Les échantillons à analyser sont dilués pour atteindre une concentration inférieure à 40 mg/L puis filtrés (filtre à membrane, 0,45 µm).
Les temps de rétention sont suffisamment éloignés entre chaque pic pour bien les différencier, si ce n'est entre le xylose et le mannose, dont les résultats sont jugés cependant fiables (Figure 98).

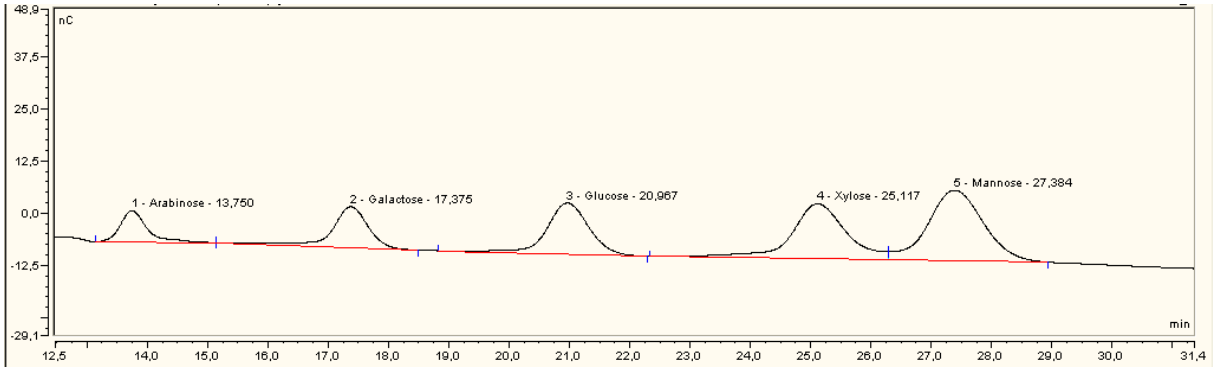


Figure 98 : Exemple de spectre obtenu pour une autohydrolyse 170 ayant subie un traitement secondaire de dépolymérisation

La répétabilité de l'appareil a été évaluée en analysant dix fois de suite le même échantillon. Aucune déviation n'a été observée (Figure 99). Les variations des mesures sont inférieures à

2,5% (Tableau 55). Un coefficient de variation de 5% a été pris pour référence dans les calculs d'incertitudes.

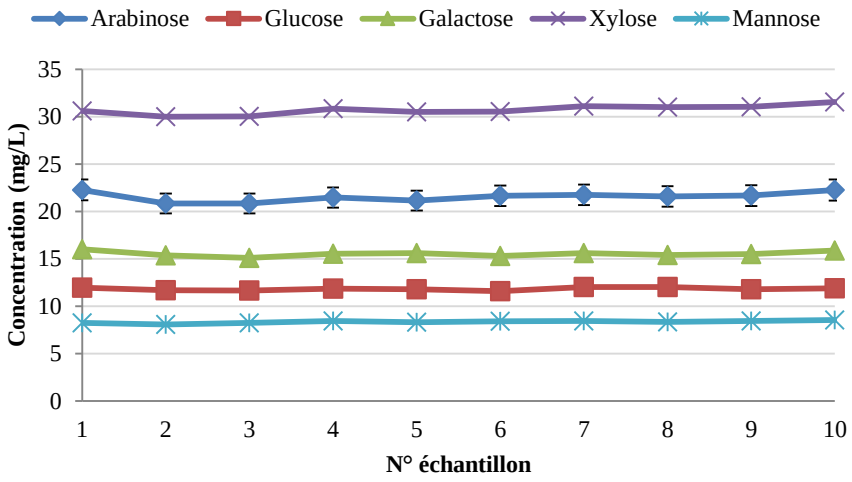


Figure 99 : Concentrations en saccharides d'un échantillon analysé dix fois de suite pour évaluer la répétabilité de l'analyse des saccharides

	CV
Arabinose	1,52%
Glucose	1,05%
Galactose	1,37%
Xylose	0,35%
Mannose	2,39%

Tableau 55 : Coefficients de variation mesurés lors de l'étude de la répétabilité de l'analyse de saccharides

1.2 Analyse des polysaccharides

Le système de chromatographie précédent détecte uniquement les monosaccharides. Pour connaître la teneur en oligomères et polymères, il est indispensable d'effectuer une dépolymérisation totale de ces molécules, puis d'analyser de nouveau l'échantillon. Ensuite, par différence entre la mesure des monosaccharides et celle-ci, la teneur en polysaccharides peut être déterminée.

Pour obtenir une dépolymérisation totale, une méthode de référence est utilisée [173]. Dans un tube à essai, 5 mL de solution sont mélangés à 1 mL d'acide sulfurique à 24% (w/w). Le tube est hermétiquement fermé et placé 60 min à 120°C dans un chauffe-tube avant d'être refroidit dans de l'eau fraiche. Les concentrations mesurées sont bien entendu multipliées par $\frac{6}{5}$ pour obtenir les teneurs réelles, avant la dépolymérisation.

2 Teneur en autres composés

Les teneurs en HMF, furfural, éthanol, glycérol, acides acétique, formique et lévulinique sont mesurées par *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). La chaine de chromatographie est composée d'une pompe et d'un passeur d'échantillon de marque Thermo Fisher, d'une pré-colonne (3 mm × 5 mm, Varian) et d'une colonne à échange de ligand (Hi-Plex H 7,7 mm × 300 mm, Varian) placées dans une enceinte thermostatée à 65°C. Le détecteur utilisé est un refractomètre ERC 1715A. L'indice de réfraction est mesuré à 35°C. L'éluant est constitué d'acide sulfurique à 5 mmol/L, dont le débit est fixé à 0,6 mL/min. Le logiciel ChromQuest, fourni par Thermo Fisher, est utilisé pour traiter les analyses. Le volume d'injection est de 10 µL.

Les temps de rétention des différentes espèces détectées sont donnés dans le Tableau 56. Les pics représentants le glycérol et l'acide formique sont quasiment superposés. Ainsi, il est impossible d'en mesurer la concentration quand les deux espèces sont présentes. Il a été considéré que lors d'une fermentation ne contenant pas d'acide formique initialement, seul du glycérol était créé. Par ailleurs, lors d'une hydrolyse, il a été considéré que seul de l'acide formique était présent dans l'hydrolysat. Généralement, il est possible visuellement, à la forme du pic, de savoir si les deux espèces sont présentes.
Les pics formés pas l'acide formique et l'acide lévulinique sont également très proches. Il est impossible de déceler la présence d'une faible quantité d'acide lévulinique couplée à une forte concentration en acide acétique. C'est notamment le cas pour les hydrolysats concentrés (cf. chapitre II, partir C.2.3 et chapitre III).

	Temps de rétention (min)
Glycérol	14,3
Acide formique	14,5
Acide acétique	15,8
Acide lévulinique	16,6
Ethanol	22,1
HMF	29,8
Furfural	43,7

Tableau 56 : Temps de rétention des composés mesurés par HPLC

Deux séries de quatre standards sont injectées au début de chaque séquence d'injection, dont les concentrations sont données dans le Tableau 57. Ainsi, les étalonnages des espèces aux temps de rétentions proches ne sont pas biaisés. Les échantillons analysés sont dilués si les concentrations des produits analysés sont supérieures aux concentrations du standard 1.
Ils sont ensuite filtrés (0,45 µm en nylon). Les échantillons contenant des hydrolysats sont de plus filtrés pour éliminer les cations métalliques qu'ils contiennent, ceux-ci pouvant se greffer sur la résine de la colonne, diminuant son efficacité. Un filtre seringue doté d'une résine échangeuse d'ion est utilisé (filtres Bond Elut Jr-SCX, 500 mg d'Agilent Technologies).

Série	Niveau d'étalonnage	1	2	3	4
1	Acide formique	6,10	4,57	3,05	1,52
	Acide acétique	3,95	2,96	1,98	0,99
	Ethanol	6,95	5,21	3,48	1,74
	HMF	2,69	2,01	1,34	0,67
	Furfural	4,87	3,65	2,44	1,22
2	Glycérol	5,00	3,75	2,50	1,25
	Acide lévulinique	2,59	1,94	1,29	0,65

Tableau 57 : Concentrations des standards utilisés lors des mesures effectuées avec l'HPLC (g/L)

Une étude de la répétabilité des mesures a été effectuée. Un échantillon d'autohydrolysat, contenant de l'acide formique, de l'acide acétique, du HMF et du furfural a été analysé dix fois de suite. Comme pour l'analyse des saccharides, aucun déviation n'est observée (Figure 100). Les coefficients de variations calculés ne dépassent pas 3% (Tableau 58). Comme pour l'analyse des saccharides, un coefficient de variation de 5% a été appliqué dans le calcul des incertitudes.

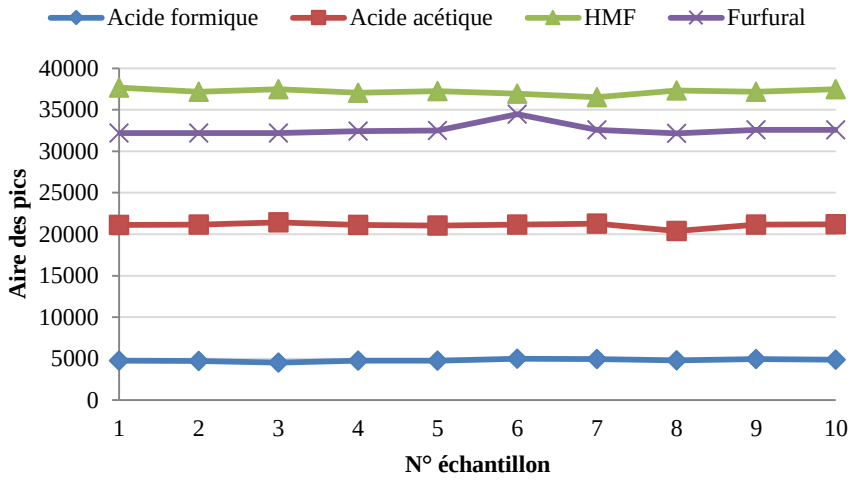


Figure 100 : Aires des pics d'un échantillon analysé dix fois de suite pour déterminer la répétabilité de la mesure

	CV
Acide formique	2,91%
Acide acétique	1,26%
HMF	0,88%
furfural	2,13%

Tableau 58 : Coefficients de variation mesurés lors de l'étude la répétabilité de la chaîne HPLC

3 Composition des copeaux

Les compositions moyennes des copeaux de bois de départ et après autohydrolyse 170 ont été mesurées (cf. chapitre II, partie A et B.2). Les copeaux de bois sont laissés plusieurs jours à l'air ambiant pour les sécher et homogénéiser leur humidité. Ils sont ensuite broyés et tamisés (60 mesh) et leur humidité mesurée.

3.1 Extraits

La teneur en extraits à l'acétone a été mesurée sur les copeaux du bois de départ broyés en utilisant un ASE (*Accelerated Solvant Extractor*), en l'occurrence l'ASE 5000 de Dionex.
L'échantillon, 7 à 8 grammes, est inséré dans une cellule en zirconium qui est ensuite placé dans l'appareil.
Le cycle suivant est programmé dans l'appareil : montée en température à 100 °C—Remplissage de la cellule avec l'acétone—Maintien de la température de 100 °C pendant 5 min—Purge de l'acétone avec de l'azote pendant 290s.
Ce cycle est effectué trois fois de suite sur la cellule, qui est ensuite rincée à l'acétone une dernière fois. Le bois moulu est ensuite récupéré, séché et pesé. La différence de masse avec le bois introduit avant l'extraction permet de déterminer le taux d'extraits à l'acétone contenu dans le bois.

3.2 Composition en saccharides

Pour connaître la composition en saccharides du bois, le bois moulu et extrait à l'acétone est entièrement hydrolysé, selon la norme TAPPI T 249 cm-00.
Une première hydrolyse est effectuée sur 350 mg de bois avec 3 mL d'acide sulfurique 72% (w/w) pendant 60 min à 30°C dans un tube à essai. Ensuite, 84 mL d'eau distillée sont ajoutés et le tout est transféré dans une bouteille en verre. Celle-ci est hermétiquement fermée pour effectuer une seconde hydrolyse dans un autoclave à 120°C pendant 60 min. Le contenu de la bouteille est alors filtré (creuset de porosité 4). A la suite de ces deux hydrolyses, l'ensemble de la cellulose et des hémicelluloses est hydrolysé sous forme de monomères, qui se trouvent dans le filtrat. Celui-ci est analysé avec la HPAEC-PAD vue ci-dessus pour connaître les compositions en saccharides. Deux dilutions sont utilisées. Une grande (facteur de dilution de 50) pour évaluer la teneur en glucose, et une plus faible (facteur de dilution de 10) pour évaluer les teneurs pour les autres saccharides présents en plus faible quantité.

Les teneurs en hexoses et pentoses sont corrigées pour obtenir les hexosanes et pentosanes correspondants présents dans le bois. Il est tenu compte du gain d'une molécule d'eau pendant leur hydrolyse. Les Equation 23 et 24 donnent les équivalences, calculées à partir des masses molaires

Equation 23

$$\text{Pentosanes} = \frac{132}{150} \times \text{pentoses}$$

Equation 24

$$\text{Hexosanes} = \frac{180}{162} \times \text{hexoses}$$

La teneur en acide acétique peut être mesurée avec l'HPLC vue ci-dessus afin d'évaluer la teneur initiale en groupes acétyles. La teneur en groupes acétyles est calculée suivant l'Equation 25. La teneur en groupes acétyles dans le bois a été déterminée pendant les prétraitements. Lors de hydrolyses acide menées avec 1 et 3% d'acide sulfurique par rapport au bois et de l'extraction alcaline, la quantité de groupes acétyles extraite est dans chaque cas de 1,3 gramme pour 100 g de bois. Il a été considéré que dans ces cas, la totalité des groupes acétyles avaient été extraits.

Equation 25

$$C_{\text{groupes acétyles}} = \frac{43}{60} C_{\text{acide acétique}}$$

3.3 Teneur en lignine klason et lignine soluble dans l'acide

3.3.1 Teneurs dans le bois

Les teneurs en lignine des copeaux de bois de départ et après chaque prétraitement ont été évaluées par la norme TAPPI T 222 om-88 pour la lignine klason et TAPPI UM 250 pour la lignine soluble dans l'acide.

Pour la lignine klason, 1 g de bois moulu extrait à l'acétone est mélangé à 15 mL d'acide sulfurique à 72% (w/w). Le tout est laissé à hydrolyser pendant 2 heures à 20°C, puis est transféré dans un erlenmeyer dans lequel de l'eau distillée a été ajoutée pour atteindre un volume total de 575 mL. Une seconde hydrolyse est alors menée en laissant bouillir 4 heures le mélange sans fermer l'erlenmeyer. De l'eau distillée est ajoutée régulièrement pour compenser les pertes dues à l'évaporation. La solution est ensuite filtrée (creuset de porosité 4 dont la masse est connue). La matière n'ayant pas pu passer à travers le creuset représente la lignine klason. Le creuset est séché 24h dans une étuve à 105°C puis pesé pour déterminer la proportion de lignine klason présente dans le bois.

Le filtrat est utilisé pour déterminer la quantité de lignine soluble dans l'acide présente dans le bois. Cette teneur est donnée par la mesure d'absorbance à 205 nm de ce filtrat, par rapport à une solution de référence composée d'acide sulfurique à 3% (w/w). La concentration en acide sulfurique est en effet de 3% dans le filtrat. L'absorbance doit être située entre 0,2 et 0,7, une dilution peut être nécessaire (effectuée avec de l'acide sulfurique 3%).
La concentration en lignine soluble est donnée par l'équation suivante :

Equation 26

$$\text{Concentration lignine soluble (g/L)} = \frac{\text{absorbance}}{110} \times \text{D}$$

Avec D : facteur de dilution

3.3.2 Teneur dans les hydrolysats

La lignine extraite lors des prétraitements acides peut être mesurée de deux façons : en calculant la différence entre la teneur dans les copeaux avant et après extraction, ou directement dans les hydrolysats, en utilisant les données de la norme TAPPI UM 250. Les hydrolysats ont été dilués avec de l'acide sulfurique à 3% pour atteindre une absorbance à 205 nm située entre 0,2 et 0,7. L'Equation 26 est alors utilisés. De plus, la mesure de lignine a été corrigée du fait de la présence du furfural, espèce qui absorbe également à 205 nm. L'absorbance due au furfural a été évaluée. Une courbe reliant l'absorbance à la concentration en furfural pur (Figure 101 et Equation 27) permet de calculer dans un hydrolysat la part d'absorbance à 205 nm dévolue au furfural, dont on connaît la concentration. Ainsi, cette absorbance peut être retranchée à l'absorbance globale.
La part due au furfural est toutefois relativement faible, elle représente 7% de l'absorbance due à la lignine dans le cas de l'hydrolyse acide, et moins de 1% pour les autohydrolyses.

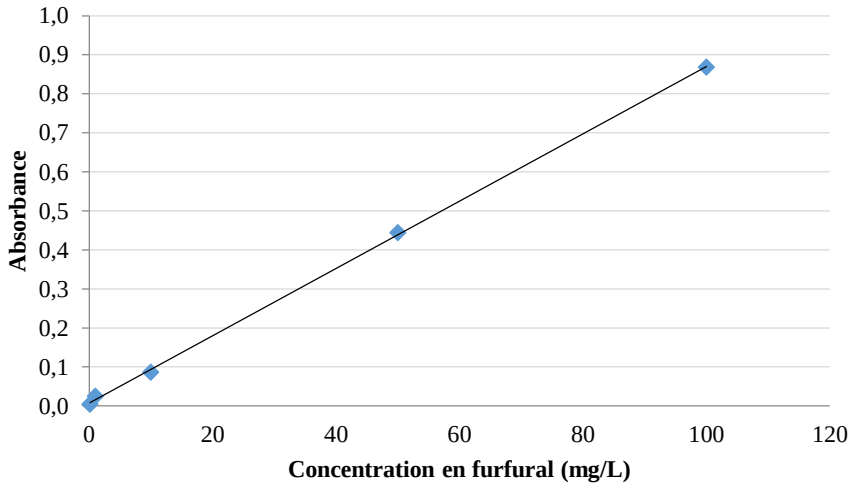


Figure 101 : Absorbance à la longueur d'onde de 250 nm du furfural

Equation 27

$$\text{Absorbance} = 0{,}0086 \times C_{\text{furfural}} + 0{,}0075$$

Avec C : Concentration en furfural en mg/L

La lignine mesurée de cette façon dans les hydrolysats provient de la lignine soluble dans l'acide, mais également de composés de lignine klason ayant été extraits du bois, sans pouvoir les distinguer. C'est pourquoi il n'est fait mention que de lignine, au sens large, dans les parties correspondantes (chapitre II).

3.4 Calcul de la composition en hémicelluloses et cellulose

Le calcul de la composition des copeaux (cf. chapitre II, partie A) a été fait à partir d'une publication de Janson [169]. Les paramètres utilisés sont données dans le Tableau 59.

Paramètres d'entrée		Variable	Valeur choisie
g pour 100 g de saccharides dans l'échantillon, sous forme hydratée	Galactose	GA	3,5%[1]
	Glucose	GL	67,6%[1]
	Mannose	MA	17,0%[1]
	Arabinose	AR	3,4%[1]
	Xylose	XY	8,5%[1]
% dans l'échantillon des non saccharides (lignine et groupes acétyles)		S	38,9%[1]
ratio molaire arabinose/xylose dans xylane		A	0,09—0,14[2]
ratio molaire mannose/glucose dans GGM		M	2,8—4,3[2]
ratio molaire galactose/glucose dans GGM		G	0,2—1[2]

Tableau 59 : Variables d'entrées pour le calcul la teneur en hémicelluloses [1]Valeurs mesurées [2]Valeurs déterminées dans la littérature (chapitre I, partie A.1)

A partie de ces variables, il est possible de déterminer la teneur totale en polysaccharides (P, Equation 28), et la quantité de polysaccharides pour 100 g de monosaccharides (N, Equation 29), en prenant en compte les ratios déjà utilisés dans les Equations 21 et 22.
Ces nouvelles variables permettent de déterminer les teneurs en xylanes (Equation 30), GGM (Equation 31) et Cellulose (Equation 32) de l'échantillon analysé. Les groupes acétyles ne sont pas pris en compte dans cette étude. Il a été considéré qu'ils étaient intégralement liés aux GGM. Ainsi la teneur exacte en GGM est donnée par l'Equation 33.

Equation 28

$$P = 100 - S$$

Equation 29

$$N = 0{,}88 \times (XY + AR) + 0{,}90 \times (GA + GL + MA)$$

Equation 30

$$XYLANES = \frac{0{,}88 \times XY \times (1 + A) \times P}{N}$$

Equation 31

$$GGM = \frac{0{,}90 \times MA \times \left(1 + \frac{1}{M} + \frac{G}{M}\right) \times P}{N}$$

Equation 32

$$CELLULOSE = \frac{0{,}90 \times (GL - \frac{MA}{M}) \times P}{N}$$

Equation 33

$$GGM_{total} = GGM + Acétyles$$

Acétyles : teneur en groupes acétyles en gramme pour 100 g de bois

[1] J. F. Kadla et R. D. Gilbert, « Cellulose structure : A review », *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 34, nº 3‑4, p. 197‑216.
[2] R. M. Brown, « Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? », *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, vol. 42, nº 3, p. 487–495, 2004.
[3] H. Sixta, *Handbook of Pulp, Volume 1*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
[4] Y. Sun et J. Cheng, « Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review », *Bioresour. Technol.*, vol. 83, nº 1, p. 1‑11, mai 2002.
[5] D. Fengel et G. Wegener, *WOOD. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter Berlin- New York, 1984.
[6] A. J. Ragauskas, M. Nagy, D. H. Kim, C. A. Eckert, J. P. Hallett, et C. L. Liotta, « From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production », *Ind. Biotechnol.*, vol. 2, nº 1, p. 55‑65, mars 2006.
[7] F. M. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, et R. Bogel-Lukasik, « Hemicelluloses for fuel ethanol: A review », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 13, p. 4775–4800, 2010.
[8] C. Laine, « Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp », juin 2005.
[9] J. Ralph, G. Brunow, et W. Boerjan, « Lignins », in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
[10] M. Lawoko, G. Henriksson, et G. Gellerstedt, « Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (Picea abies L.) isolated with two methods », *Holzforschung*, vol. 60, nº 2, p. 156‑161, mars 2006.
[11] B. Kamm et M. Kamm, « Principles of biorefineries », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, nº 2, p. 137‑145, avr. 2004.
[12] C. Chirat, D. Lachenal, et A. Dufresne, « Biorefinery in a kraft pulp mill: from bioethanol to cellulose nanocrystals », *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 44, nº 1, p. 59, 2010.
[13] N. Lavoine, I. Desloges, A. Dufresne, et J. Bras, « Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review », *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, nº 2, p. 735‑764, oct. 2012.
[14] A. Baylis, « Les Sohettes: A model for integrated biorefineries », *Biofuels Bioprod. Biorefining*, vol. 4, nº 2, p. 115–117, 2010.
[15] T. Werpy, G. Petersen, A. Aden, J. Bozell, J. Holladay, J. White, A. Manheim, D. Eliot, L. Lasure, et S. Jones, « Top Value Added Chemicals From Biomass. Volume 1-Results of Screening for Potential Candidates From Sugars and Synthesis Gas », DTIC Document, 2004.
[16] J. J. Bozell et G. R. Petersen, « Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10" revisited », *Green Chem.*, vol. 12, nº 4, p. 539, 2010.
[17] B. Thorp, « The Verdict Is In: Biofuels Boom », in *US Forest Prod· ucts Laboratory: Society of American Foresters Annual Meeting Ore—gun Convention Center, Po∼land, Oregon*, 2007.
[18] E. Hytönen et P. Stuart, « Integrating Bioethanol Production into an Integrated Kraft Pulp and Paper Mill: Techno-Economic Assessment », *PULP Pap. Can.*, p. 25‑32, 2009.
[19] M. Marklund, R. Tegman, et R. Gebart, « CFD modelling of black liquor gasification: Identification of important model parameters », *Fuel*, vol. 86, nº 12, p. 1918–1926, 2007.
[20] D. T. Ferro, V. Vigouroux, A. Grimm, et R. Zanzi, « Torrefaction of agricultural and forest residues », *Cuba. April*, p. 12–16, 2004.
[21] M. Pach, R. Zanzi, et E. Björnbom, « Torrefied biomass a substitute for wood and charcoal », in *6th Asia-Pacific International Symposium on Combustion and Energy Utilization*, 2002, p. 20–22.

[22] A. V. Bridgwater, « Principles and practice of biomass fast pyrolysis processes for liquids », *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 51, nº 1‑2, p. 3‑22, juill. 1999.
[23] D. Sutton, B. Kelleher, et J. R. Ross, « Review of literature on catalysts for biomass gasification », *Fuel Process. Technol.*, vol. 73, nº 3, p. 155–173, 2001.
[24] L. Devi, K. J. Ptasinski, et F. J. J. . Janssen, « A review of the primary measures for tar elimination in biomass gasification processes », *Biomass Bioenergy*, vol. 24, nº 2, p. 125‑140, févr. 2003.
[25] H.-M. Yang et P.-H. Liao, « Preparation and activity of Cu/ZnO-CNTs nano-catalyst on steam reforming of methanol », *Appl. Catal. Gen.*, vol. 317, nº 2, p. 226–233, 2007.
[26] J. He et W. Zhang, « Research on ethanol synthesis from syngas », *J. Zhejiang Univ. Sci. A*, vol. 9, nº 5, p. 714‑719, mars 2008.
[27] « RFA: Renewable Fuels Association ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.ethanolrfa.org/. [Consulté le: 06-mars-2014].
[28] « F.O Licht's World Ethanol and Biofuels report ».
[29] « Food and agriculture Organization of the United Nations », *FAOSTAT*. [En ligne]. Disponible sur: http://www.fao.org/statistics/en/. [Consulté le: 25-sept-2013].
[30] K. E. Vroom, « The H factor: a means of expressing cooking times and temperatures as a single variable », *Pulp Pap. Mag. Can.*, vol. 58, nº 3, p. 228–231, 1957.
[31] J. R. GEORGE, « Delignification prolongee en milieu alcalin a l'aide d'un reacteur a lit fixe et a faible temps de passage. Application a la fabrication de la pate a papier », INP GRENOBLE, 1998.
[32] R. E. Lapointe, *Précis de chimie de la cellulose*. Cheneliere-mcgraw hill, 2000.
[33] E. Brännvall, A. Teder, H. Höglund, L. Miliander, U. Germgard, H. Theliander, B. Backlund, P. Engstrand, B. Johansson, et G. Annergren, *The Ljungberg Textbook: Pulp technology 2004*. 2004.
[34] E. Sjöström, *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Access Online via Elsevier, 1993.
[35] A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, et T. Tschaplinski, « The Path Forward for Biofuels and Biomaterials », *Science*, vol. 311, nº 5760, p. 484‑489, janv. 2006.
[36] P. Morandini, F. Salamini, et P. Gantet, « Engineering of Plant Metabolism for Drug and Food », *Curr. Med. Chem. - Immunol. Endocr. Metab. Agents*, vol. 5, nº 2, p. 103‑112, avr. 2005.
[37] A. Dufresne, *Nanocellulose: from nature to high performance tailored materials*. Berlin: Walter De Gruyter, 2012.
[38] A. van Heiningen, « Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. », *Pulp Pap. Can.*, vol. 107, nº 6, p. T141‑T146, 2006.
[39] H.-J. Huang, S. Ramaswamy, W. W. Al-Dajani, et U. Tschirner, « Process modeling and analysis of pulp mill-based integrated biorefinery with hemicellulose pre-extraction for ethanol production: A comparative study », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 2, p. 624‑631, janv. 2010.
[40] S.-H. Yoon et A. van Heiningen, « Green liquor extraction of hemicelluloses from southern pine in an Integrated Forest Biorefinery », *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 16, nº 1, p. 74‑80, janv. 2010.
[41] H. L. Chum, D. K. Johnson, S. K. Black, et R. P. Overend, « Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 24‑25, nº 1, p. 1‑14, mars 1990.
[42] B. Grylls, *Born Survivor: Bear Grylls*. London: Channel 4, 2007.

[43] Kyoung heon Kim, « Two-stage dilute acid-catalyzed hydrolytic conversion of softwood sawdust into sugars fermentable by ethanologenic microorganisms », *J. Sci. Food Agric.*, vol. 85, nº 14, p. 2461‑2467, nov. 2005.
[44] A. P. Dunlop, « Furfural formation and behavior », *Ind. Eng. Chem.*, vol. 40, nº 2, p. 204–209, 1948.
[45] R. J. Ulbricht, S. J. Northup, et J. A. Thomas, « A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions », *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 4, nº 5, p. 843–853, 1984.
[46] M. J. Taherzadeh et K. Karimi, « Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials : a review », *BioResources*, vol. 2, nº 3, p. 472‑499, août 2007.
[47] J. R. M. Almeida, M. Bertilsson, M. F. Gorwa-Grauslund, S. Gorsich, et G. Lidén, « Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, nº 4, p. 625‑638, janv. 2009.
[48] K. Hoyer, M. Galbe, et G. Zacchi, « Production of fuel ethanol from softwood by simultaneous saccharification and fermentation at high dry matter content », *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 84, nº 4, p. 570‑577, avr. 2009.
[49] N. Mosier, « Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass », *Bioresour. Technol.*, vol. 96, nº 6, p. 673‑686, avr. 2005.
[50] T. Song, A. Pranovich, I. Sumerskiy, et B. Holmbom, « Extraction of galactoglucomannan from spruce wood with pressurised hot water », *Holzforschung*, vol. 62, nº 6, p. 659‑666, nov. 2008.
[51] G. Garrote, H. Dominguez, et J. C. Parajó, « Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood », *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 74, nº 11, p. 1101–1109, 1999.
[52] M. S. Tunc et A. R. P. van Heiningen, « Hemicellulose Extraction of Mixed Southern Hardwood with Water at 150 °C: Effect of Time », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 47, nº 18, p. 7031‑7037, 2008.
[53] A.-D. Wafa, U. W. Tschirner, et T. Jensen, « Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part II: acid- and autohydrolysis. », *Tappi J.*, vol. 8, nº 9, p. 30‑37, 2009.
[54] J. Krogell, E. Korotkova, K. Eränen, A. Pranovich, T. Salmi, D. Murzin, et S. Willför, « Intensification of hemicellulose hot-water extraction from spruce wood in a batch extractor – Effects of wood particle size », *Bioresour. Technol.*, vol. 143, p. 212‑220, sept. 2013.
[55] E. L. Springer, « Prehydrolysis of hardwoods with dilute sulfuric acid », *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, vol. 24, nº 4, p. 614‑623, déc. 1985.
[56] J. F. Saeman, « Kinetics of wood saccharification-hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature », *Ind. Eng. Chem.*, vol. 37, nº 1, p. 43–52, 1945.
[57] L. Boiron, « Etude de l'impact de l'extraction des hémicelluloses du bois sur les procédés d'obtention de cellulose et d'éthanol dans le cadre d'une bioraffinerie lignocellulosique », Université de Grenoble, Saint Martin d'Hères, 2012.
[58] J. Kautto, E. Saukkonen, et K. Henricson, « Digestibility and paper making properties of prehydrolyzed softwood chips », *BioResources*, vol. 5, nº 4, p. 2502‑2519, oct. 2010.
[59] C. V. T. Mendes, J. M. S. Rocha, G. D. A. Sousa, et M. Carvalho, « Extraction of hemicelluloses prior to kraft cooking: A step for an integrated biorefinery in the pulp mill », *O Pap.*, vol. 72, nº 9, p. 79–83, 2011.
[60] W. W. Al-Dajani et U. W. Tschirner, « Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent ASA and ASAM pulping: Comparison of autohydrolysis and alkaline extraction », *Holzforschung*, vol. 64, nº 4, p. 411‑416, juin 2010.

[61] H. Lu, R. Hu, A. Ward, T. E. Amidon, B. Liang, et S. Liu, « Hot-water extraction and its effect on soda pulping of aspen woodchips », *Biomass Bioenergy*, vol. 39, p. 5–13, 2012.
[62] S.-H. Yoon et A. Van Heiningen, « Kraft pulping and papermaking properties of hot-water pre-extracted loblolly pine in an integrated forest products biorefinery », *Tappi J*, vol. 7, nº 7, p. 22–27, 2008.
[63] C. V. T. Mendes, M. G. V. S. Carvalho, C. M. S. G. Baptista, J. M. S. Rocha, B. I. G. Soares, et G. D. A. Sousa, « Valorisation of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept », *Food Bioprod. Process.*, vol. 87, nº 3, p. 197‑207, sept. 2009.
[64] P. Mäki-Arvela, T. Salmi, B. Holmbom, S. Willför, et D. Y. Murzin, « Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses--a review », *Chem. Rev.*, vol. 111, nº 9, p. 5638‑5666, sept. 2011.
[65] S.-H. Yoon, K. Macewan, et A. Van Heiningen, « Hot-water pre-extraction from loblolly pine (Pinus taeda) in an integrated forest products biorefinery », *Tappi J.*, vol. 7, nº 6, p. 27–32, 2008.
[66] S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, et N.-O. Nilvebrant, « The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 24, nº 3‑4, p. 151‑159, févr. 1999.
[67] W. Frederick, S. Lien, C. Courchene, N. Demartini, A. Ragauskas, et K. Iisa, « Co-production of ethanol and cellulose fiber from Southern Pine: A technical and economic assessment », *Biomass Bioenergy*, vol. 32, nº 12, p. 1293‑1302, déc. 2008.
[68] W. W. Al-Dajani et U. W. Tschirner, « Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part I: alkaline extraction », *Tappi J.*, vol. 7, nº 6, p. 3‑8, 2008.
[69] S. N'Diaye, L. Rigal, P. Larocque, et P. F. Vidal, « Extraction of hemicelluloses from poplar, Populus tremuloides, using an extruder-type twin-screw reactor: A feasibility study », *Bioresour. Technol.*, vol. 57, nº 1, p. 61‑67, juill. 1996.
[70] S. N'Diaye et L. Rigal, « Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in a twin-screw reactor: correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase », *Bioresour. Technol.*, vol. 75, nº 1, p. 13‑18, oct. 2000.
[71] S. Walton, « Biological Conversion of Hemicellulose Extract into Value-Added Fuels and Chemicals », University of Maine, Orono, USA, 2009.
[72] H. Sun, Y. K. Xu, et G. Z. Xu, « Isolation of hemicellulose from wood chips via extraction with kraft green liquor », *Chem Res Chin Univ*, vol. 26, p. 667, 2010.
[73] S.-H. Yoon, M. S. Tunc, et A. van Heiningen, « Near-neutral pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping of southern mixed hardwoods », *Tappi J.*, vol. 10, nº 1, p. 7‑15, 2011.
[74] A. Arkell, H. Krawczyk, J. Thuvander, et A.-S. Jönsson, « Evaluation of membrane performance and cost estimates during recovery of sodium hydroxide in a hemicellulose extraction process by nanofiltration », *Sep. Purif. Technol.*, vol. 118, p. 387‑393, oct. 2013.
[75] F. Huang et A. Ragauskas, « Extraction of Hemicellulose from Loblolly Pine Woodchips and Subsequent Kraft Pulping », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, nº 4, p. 1743‑1749, janv. 2013.
[76] J. Helmerius, J. V. von Walter, U. Rova, K. A. Berglund, et D. B. Hodge, « Impact of hemicellulose pre-extraction for bioconversion on birch Kraft pulp properties », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 15, p. 5996‑6005, août 2010.
[77] S. L. Walton, D. Hutto, J. M. Genco, G. P. van Walsum, et A. R. P. van Heiningen, « Pre-Extraction of Hemicelluloses from Hardwood Chips Using an Alkaline Wood Pulping

Solution Followed by Kraft Pulping of the Extracted Wood Chips », *Ind. Eng. Chem. Res.*, nov. 2010.
[78] H. Mao, J. M. Genco, S.-H. Yoon, A. van Heiningen, et H. Pendse, « Technical Economic Evaluation of a Hardwood Biorefinery Using the "Near-Neutral" Hemicellulose Pre-Extraction Process », *J. Biobased Mater. Bioenergy*, vol. 2, nº 2, p. 177‑185, juin 2008.
[79] N. Jacquet, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, Michel Paquot, Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, et Michel Paquot, « La steam explosion : application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique », *Biotechnol. Agron. Société Environ.*, vol. 14, p. 561‑566, 2010.
[80] A. Boussaid, J. Robinson, Y. Cai, D. J. Gregg, et J. N. Saddler, « Fermentability of the hemicellulose-derived sugars from steam-exploded softwood (douglas fir) », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 64, nº 3, p. 284‑289, août 1999.
[81] M. M. Wu, K. Chang, D. J. Gregg, A. Boussaid, R. P. Beatson, et J. N. Saddler, « Optimization of Steam Explosion to Enhance Hemicellulose Recovery and Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Softwoods », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 77, nº 1‑3, p. 47‑54, 1999.
[82] S. Shevchenko, « Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicellulose component after steam explosion of softwood chips », *Bioresour. Technol.*, vol. 72, nº 3, p. 207‑211, mai 2000.
[83] Z. Kádár, S. F. Maltha, Z. Szengyel, K. Réczey, et W. Laat, « Ethanol fermentation of various pretreated and hydrolyzed substrates at low initial pH », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 137‑140, nº 1‑12, p. 847‑858, avr. 2007.
[84] D. Ballerini, D. Casanave, A. Forestière, S. Lacombe, et X. Montagne, « Chapitre 2 : L'éthanol et l'ETBE », in *Les biocarburants*, Editions TECHNIP, 2006.
[85] « Advances in lignocellulosic ethanol The NILE project », 2009. [En ligne]. Disponible sur: http://www.baff.info/pdf/NILE_brochure_FurtherAdvances.pdf. [Consulté le: 09-oct-2013].
[86] « Further advances in lignocellulosic ethanol The NILE project », 2010. [En ligne]. Disponible sur: http://www.baff.info/pdf/NILE_brochure_FurtherAdvances.pdf. [Consulté le: 09-oct-2013].
[87] « Projet futurol ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.projet-futurol.com/. [Consulté le: 09-oct-2013].
[88] H. Jørgensen, J. B. Kristensen, et C. Felby, « Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities », *Biofuels Bioprod. Biorefining*, vol. 1, nº 2, p. 119‑134, oct. 2007.
[89] M. J. Taherzadeh et K. Karimi, « Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. », *BioResources*, vol. 2, nº 4, p. 707‑738, 2007.
[90] B. C. Saha, « Hemicellulose bioconversion », *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, nº 5, p. 279‑291, mai 2003.
[91] M. Tenkanen, « Action of Trichoderma reesei mannanase on galactoglucomannan in pine kraft pulp », *J. Biotechnol.*, vol. 57, nº 1‑3, p. 191‑204, sept. 1997.
[92] I. Kusakabe, G. G. park, N. Kumita, T. Yasui, et K. Murakami, « Specificity of β-Mannanase from Penicillium purpurogenum for Konjac Glucomannan(Biological Chemistry) », *Agric. Biol. Chem.*, vol. 52, nº 2, p. 519‑524, févr. 1988.
[93] F. Franz et T. Hans, « Process for the production of paraffin-hydrocarbons with more than one carbon atom », US1746464 A, 11-févr-1930.

[94] A. D. Padula, M. S. Santos, L. Ferreira, et D. Borenstein, « The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects », *Energy Policy*, vol. 44, p. 395‑405, mai 2012.
[95] H. Maula, « Neste Oil starts up its new renewable diesel plant in Singapore ». 15-nov-2010.
[96] D. Lorne, « Le point sur les biocarburants : progression des marchés nationaux et internationaux ». IFPEN, nov-2011.
[97] J. Verne, *Les Enfants du Capitaine Grant*. Pierre-Jules Hetzel, 1868.
[98] « Eurostat : La statistique européenne ». [En ligne]. Disponible sur: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home. [Consulté le: 24-sept-2013].
[99] « IEA International Energy Agency ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.iea.org/. [Consulté le: 24-sept-2013].
[100] « EIA : U.S. Energy Information Administration ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.eia.gov/. [Consulté le: 24-sept-2013].
[101] « DIRECTIVE 2009/28/CE du parlement européen et du conseil relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables ». 23-avr-2009.
[102] J. Ziegler, « conférence de presse à l'ONU : "Jean Ziegler qualifie le recours aux biocarburants de "crime contre l'humanité"". » 26-oct-2007.
[103] E. D. D.- ADEME, « Analyses de Cycle de Vie appliquées aux biocarburants de première génération consommés en France », 2010.
[104] S. De Cara, A. Goussebaïle, R. Grateau, F. Levert, J. Quemener, B. Vermont, J.-C. Bureau, B. Gabrielle, A. Gohin, et A. Bispo, « Revue critique des études évaluant l'effet des changements d'affectation des sols sur les bilans environnementaux des biocarburants », rapport de l'ADEME, 2012.
[105] H. de Cherisey, « Panorama et potentiel de developpements des bioraffineries », ADEME, oct. 2010.
[106] F. Bai, W. Anderson, et M. Mooyoung, « Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks », *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, nº 1, p. 89‑105, janv. 2008.
[107] Y.-S. Jin et T. W. Jeffries, « Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant Saccharomyces cerevisiae », *Metab. Eng.*, vol. 6, nº 3, p. 229‑238, juill. 2004.
[108] A. J. A. Maris, D. A. Abbott, E. Bellissimi, J. Brink, M. Kuyper, M. A. H. Luttik, H. W. Wisselink, W. A. Scheffers, J. P. Dijken, et J. T. Pronk, « Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status », *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 90, nº 4, p. 391‑418, oct. 2006.
[109] P. F. Stanbury, « Fermentation technology », *Extraction*, vol. 2, p. 1–1, 1988.
[110] E. Albers et C. Larsson, « A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains », *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, nº 8, p. 1085‑1091, août 2009.
[111] M. Johnston, J. S. Flick, et T. Pexton, « Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in Saccharomyces cerevisiae. », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, nº 6, p. 3834–3841, 1994.
[112] Y. Lin et S. Tanaka, « Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 69, nº 6, p. 627‑642, févr. 2006.
[113] G. A. Sprenger, « Carbohydrate metabolism in Zymomonas mobilis: a catabolic highway with some scenic routes », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 145, nº 3, p. 301–307, 1996.
[114] J. M. Laplace, J. P. Delgenes, R. Moletta, et J. M. Navarro, « Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: Process

considerations in relation to ethanol tolerance », *Biotechnol. Lett.*, vol. 13, nº 6, p. 445‑450, juin 1991.
[115] N. L. C. Silva, G. J. V. Betancur, M. P. Vasquez, E. Barros Gomes, et N. Pereira, « Ethanol Production from Residual Wood Chips of Cellulose Industry: Acid Pretreatment Investigation, Hemicellulosic Hydrolysate Fermentation, and Remaining Solid Fraction Fermentation by SSF Process », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 163, nº 7, p. 928‑936, oct. 2010.
[116] R. Gupta, K. K. Sharma, et R. C. Kuhad, « Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of Prosopis juliflora, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis-NCIM 3498 », *Bioresour. Technol.*, vol. 100, nº 3, p. 1214‑1220, févr. 2009.
[117] D. Scordia, S. L. Cosentino, et T. W. Jeffries, « Second generation bioethanol production from Saccharum spontaneum L. ssp. aegyptiacum (Willd.) Hack. », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 14, p. 5358‑5365, juill. 2010.
[118] S. B. Kim, J. H. Lee, K. K. Oh, S. J. Lee, J. Y. Lee, J. S. Kim, et S. W. Kim, « Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation », *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 16, nº 4, p. 725‑732, août 2011.
[119] K. Srilekha Yadav, S. Naseeruddin, G. Sai Prashanthi, L. Sateesh, et L. Venkateswar Rao, « Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis », *Bioresour. Technol.*, vol. 102, nº 11, p. 6473‑6478, juin 2011.
[120] T. Watanabe, I. Watanabe, M. Yamamoto, A. Ando, et T. Nakamura, « A UV-induced mutant of Pichia stipitis with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance », *Bioresour. Technol.*, vol. 102, nº 2, p. 1844‑1848, janv. 2011.
[121] L. R. Lynd, « Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: Critical evaluation of potential and review », in *Lignocellulosic Materials*, Springer Berlin Heidelberg, 1989, p. 1‑52.
[122] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, et I. S. Pretorius, « Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology », *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 66, nº 3, p. 506‑577, janv. 2002.
[123] A. H. Thompson, D. J. Studholme, E. M. Green, et D. J. Leak, « Heterologous expression of pyruvate decarboxylase in Geobacillus thermoglucosidasius », *Biotechnol. Lett.*, vol. 30, nº 8, p. 1359‑1365, août 2008.
[124] S. Brethauer et C. E. Wyman, « Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 13, p. 4862‑4874, juill. 2010.
[125] B. Alriksson, « Ethanol from lignocellulose : Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates », dissertation, Norwegian University of Science and Technology, 2006.
[126] H.-D. Shin, S. McClendon, T. Vo, et R. R. Chen, « Escherichia coli Binary Culture Engineered for Direct Fermentation of Hemicellulose to a Biofuel », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, nº 24, p. 8150‑8159, oct. 2010.
[127] S. Walton, A. van Heiningen, et P. van Walsum, « Inhibition effects on fermentation of hardwood extracted hemicelluloses by acetic acid and sodium », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, nº 6, p. 1935‑1940, mars 2010.
[128] A. Matsushika, H. Inoue, K. Murakami, O. Takimura, et S. Sawayama, « Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-

fermenting Saccharomyces cerevisiae », *Bioresour. Technol.*, vol. 100, nº 8, p. 2392‑2398, avr. 2009.
[129] S. Katahira, A. Mizuike, H. Fukuda, et A. Kondo, « Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, nº 6, p. 1136‑1143, mars 2006.
[130] T. Sakamoto, T. Hasunuma, Y. Hori, R. Yamada, et A. Kondo, « Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae cells », *J. Biotechnol.*, vol. 158, nº 4, p. 203‑210, avr. 2012.
[131] T. S. Khaw, Y. Katakura, J. Koh, A. Kondo, M. Ueda, et S. Shioya, « Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 70, nº 5, p. 573‑579, mai 2006.
[132] X. Q. Zhao, C. Xue, X. M. Ge, W. J. Yuan, J. Y. Wang, et F. W. Bai, « Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation », *J. Biotechnol.*, vol. 139, nº 1, p. 55‑60, janv. 2009.
[133] E. Palmqvist et B. Hahn-Hägerdal, « Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition », *Bioresour. Technol.*, vol. 74, nº 1, p. 25‑33, août 2000.
[134] F. W. Bai, L. J. Chen, W. A. Anderson, et M. Moo-Young, « Parameter oscillations in a very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on a multistage packed column bioreactor system », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 88, nº 5, p. 558‑566, déc. 2004.
[135] S. Larsson, A. Quintana-Sáinz, A. Reimann, N. O. Nilvebrant, et L. J. Jönsson, « Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by Saccharomyces cerevisiae », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 84, nº 1, p. 617–632, 2000.
[136] L. Olsson et B. Hahn-Hägerdal, « Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 18, nº 5, p. 312‑331, avr. 1996.
[137] M. J. Taherzadeh, L. Gustafsson, C. Niklasson, et G. Lidén, « Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on Saccharomyces cerevisiae », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 53, nº 6, p. 701‑708, juin 2000.
[138] M. J. Taherzadeh, L. Gustafsson, C. Niklasson, et G. Lidén, « Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by Saccharomyces cerevisiae », *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 87, nº 2, p. 169‑174, 1999.
[139] L. J. Jönsson, B. Alriksson, et N.-O. Nilvebrant, « Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification », *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, nº 1, p. 16, janv. 2013.
[140] C. Luo, D. L. Brink, et H. W. Blanch, « Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol », *Biomass Bioenergy*, vol. 22, nº 2, p. 125‑138, févr. 2002.
[141] B. L. Maiorella, H. W. Blanch, et C. R. Wilke, « Feed component inhibition in ethanolic fermentation by Saccharomyces cerevisiae », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 26, nº 10, p. 1155–1166, 1984.
[142] E. Palmqvist et Hahn-Hägerdal, « Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification », *Bioresour. Technol.*, vol. 74, nº 1, p. 17‑24, août 2000.

[143] I. S. Horváth, A. Sjöde, B. Alriksson, L. J. Jönsson, et N.-O. Nilvebrant, « Critical Conditions for Improved Fermentability During Overliming of Acid Hydrolysates from Spruce », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 124, nº 1‑3, p. 1031‑1044, 2005.
[144] B. Alriksson, A. Sjöde, N.-O. Nilvebrant, et L. J. Jönsson, « Optimal Conditions for Alkaline Detoxification of Dilute-Acid Lignocellulose Hydrolysates », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 130, nº 1‑3, p. 599‑611, 2006.
[145] A. Chandel, R. Kapoor, A. Singh, et R. Kuhad, « Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by Candida shehatae NCIM 3501 », *Bioresour. Technol.*, vol. 98, nº 10, p. 1947‑1950, juill. 2007.
[146] S. Larsson, A. Reimann, N.-O. Nilvebrant, et L. J. Jönsson, « Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 77, nº 1‑3, p. 91‑103, mars 1999.
[147] H. Huang, S. Ramaswamy, U. Tschirner, et B. Ramarao, « A review of separation technologies in current and future biorefineries », *Sep. Purif. Technol.*, vol. 62, nº 1, p. 1‑21, août 2008.
[148] A. Converti, J. M. Dominguez, P. Perego, S. S. Da Silva, et M. Zilli, « Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production », *Chem. Eng. Technol.*, vol. 23, nº 11, p. 1013–1020, 2000.
[149] B. Alriksson, A. Cavka, et L. J. Jönsson, « Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents », *Bioresour. Technol.*, vol. 102, nº 2, p. 1254‑1263, janv. 2011.
[150] B. Alriksson, I. S. Horváth, et L. J. Jönsson, « Overexpression of Saccharomyces cerevisiae transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors », *Process Biochem.*, vol. 45, nº 2, p. 264‑271, févr. 2010.
[151] T. Liu, L. Lin, Z. Sun, R. Hu, et S. Liu, « Bioethanol fermentation by recombinant E. coli FBR5 and its robust mutant FBHW using hot-water wood extract hydrolyzate as substrate », *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, nº 5, p. 602‑608, sept. 2010.
[152] D. P. Bayrock et W. M. Ingledew, « Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology », *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, nº 2, p. 87‑93, août 2001.
[153] R. Purwadi et M. Taherzadeh, « The performance of serial bioreactors in rapid continuous production of ethanol from dilute-acid hydrolyzates using immobilized cells », *Bioresour. Technol.*, vol. 99, nº 7, p. 2226‑2233, mai 2008.
[154] Y.-H. Lin, D. P. Bayrock, et W. M. Ingledew, « Evaluation of Saccharomyces cerevisiae grown in a multistage chemostat environment under increasing levels of glucose », *Biotechnol. Lett.*, vol. 24, nº 6, p. 449‑453, mars 2002.
[155] Y. Tang, M. An, K. Liu, S. Nagai, T. Shigematsu, S. Morimura, et K. Kida, « Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast Saccharomyces cerevisiae strain KF-7 », *Process Biochem.*, vol. 41, nº 4, p. 909‑914, avr. 2006.
[156] E. Palmqvist, M. Galbe, et B. Hahn-Hägerdal, « Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with Saccharomyces cerevisiae and on-line monitoring of glucose and ethanol », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 50, nº 5, p. 545‑551, nov. 1998.
[157] W. G. Lee, B. G. Park, Y. K. Chang, H. N. Chang, J. S. Lee, et S. C. Park, « Continuous Ethanol Production from Concentrated Wood Hydrolysates in an Internal Membrane-Filtration Bioreactor », *Biotechnol. Prog.*, vol. 16, nº 2, p. 302–304, 2000.

[158] T. Brandberg, N. Sanandaji, L. Gustafsson, et C. Johan Franzén, « Continuous Fermentation of Undetoxified Dilute Acid Lignocellulose Hydrolysate by Saccharomycescerevisiae ATCC 96581 Using Cell Recirculation », *Biotechnol. Prog.*, vol. 21, nº 4, p. 1093–1101, 2005.
[159] T. Brandberg, K. Karimi, M. J. Taherzadeh, C. J. Franzén, et L. Gustafsson, « Continuous fermentation of wheat-supplemented lignocellulose hydrolysate with different types of cell retention », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, nº 1, p. 80–90, 2007.
[160] R. Millati, C. Niklasson, et M. J. Taherzadeh, « Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by Saccharomyces cerevisiae », *Process Biochem.*, vol. 38, nº 4, p. 515‑522, déc. 2002.
[161] C.-Z. Liu, F. Wang, et F. Ou-Yang, « Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized Saccharomyces cerevisiae in magnetic particles », *Bioresour. Technol.*, vol. 100, nº 2, p. 878‑882, janv. 2009.
[162] M. J. Taherzadeh, R. Millati, et C. Niklasson, « Continuous Cultivation of Dilute-Acid Hydrolysates to Ethanol by Immobilized Saccharomyces cerevisiae », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 95, nº 1, p. 45‑58, 2001.
[163] J. Shen et F. A. Agblevor, « Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose », *Biomass Bioenergy*, vol. 34, nº 8, p. 1098‑1107, août 2010.
[164] C. E. Wyman, D. D. Spindler, K. Grohmann, et S. M. Lastick, « Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast Brettanomyces clausenii », *Biotechnol Bioeng*, vol. 17, p. 221–38, 1986.
[165] J. Söderström, M. Galbe, et G. Zacchi, « Separate versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Two-Step Steam Pretreated Softwood for Ethanol Production », *J. Wood Chem. Technol.*, vol. 25, nº 3, p. 187‑202, 2005.
[166] V. Gomis, A. Font, R. Pedraza, et M. D. Saquete, « Isobaric vapor–liquid and vapor–liquid–liquid equilibrium data for the system water + ethanol + cyclohexane », *Fluid Phase Equilibria*, vol. 235, nº 1, p. 7‑10, août 2005.
[167] D. J. O'Brien, L. H. Roth, et A. J. McAloon, « Ethanol production by continuous fermentation–pervaporation: a preliminary economic analysis », *J. Membr. Sci.*, vol. 166, nº 1, p. 105‑111, févr. 2000.
[168] L. M. Vane, « Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths », *Biofuels Bioprod. Biorefining*, vol. 2, nº 6, p. 553–588, 2008.
[169] J. Janson, « Calculation of the polysaccharide composition of wood and pulp. », *Pap. Ja Puu*, vol. 52, nº 5, p. 323–9, 1970.
[170] C. Chirat, G. Pipon, M. T. Viardin, D. Lachenal, J. A. Lloyd, et I. Suckling, « Hemicelluloses extraction from eucalyptus and softwood wood chips: pulp properties and ethanol production », ISWFPC, electronic proceedings O38, Oslo, Norway, 2009.
[171] M. Sanglard, « Production simultanée de fibres cellulosiques blanchies et de polyxylosides d'alkyle dans le cadre d'une bioraffinerie papetière », Université de Grenoble, Grenoble, 2013.
[172] H. Mao, « Technical evaluation of a hardwood biorefinery using the" Near-Neutral" hemicellulose extraction Process », The University of Maine, 2007.
[173] W. E. Moore et D. B. Johnson, *Procedures for the chemical analysis of wood and wood products (as used at the US Forest Products Laboratory)*. Forest Products Laboratory, Forest Service, US Dept. of Agriculture, 1967.
[174] C. Chang, P. Cen, et X. Ma, « Levulinic acid production from wheat straw », *Bioresour. Technol.*, vol. 98, nº 7, p. 1448‑1453, mai 2007.

[175] C. CHANG, X. MA, et P. CEN, « Kinetics of Levulinic Acid Formation from Glucose Decomposition at High Temperature », *Chin. J. Chem. Eng.*, vol. 14, nº 5, p. 708‑712, oct. 2006.
[176] J. Shen et C. E. Wyman, « Hydrochloric acid-catalyzed levulinic acid formation from cellulose: data and kinetic model to maximize yields », *AIChE J.*, vol. 58, nº 1, p. 236–246, 2012.
[177] B. Girisuta, L. P. B. M. Janssen, et H. J. Heeres, « Kinetic Study on the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose to Levulinic Acid », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, nº 6, p. 1696‑1708, mars 2007.
[178] B. Girisuta, L. Janssen, et H. J. Heeres, « Green chemicals: A kinetic study on the conversion of glucose to levulinic acid », *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 84, nº 5, p. 339–349, 2006.
[179] V. E. Tarabanko, M. Y. Chernyak, S. V. Aralova, et B. N. Kuznetsov, « Kinetics of levulinic acid formation from carbohydrates at moderate temperatures », *React. Kinet. Catal. Lett.*, vol. 75, nº 1, p. 117‑126, janv. 2002.
[180] G. Garrote, H. Domínguez, et J. C. Parajó, « Generation of xylose solutions from Eucalyptus globulus wood by autohydrolysis–posthydrolysis processes: posthydrolysis kinetics », *Bioresour. Technol.*, vol. 79, nº 2, p. 155‑164, sept. 2001.
[181] N. US Department of Commerce, « National Institute of Standards and Technology ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.nist.gov/. [Consulté le: 01-avr-2014].
[182] H. Huang, X. Guo, D. Li, M. Liu, J. Wu, et H. Ren, « Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids », *Bioresour. Technol.*, vol. 102, nº 16, p. 7486–7493, 2011.
[183] « RISI : the leading information provider for global forest product industry », *RISI*, 25-sept-2013. .
[184] H. Ghezzaz, L. Pelletier, et P. R. Stuart, « Biorefinery implementation for recovery debottlenecking at existing pulp mills–part II: technoeconomic evaluation », *Tappi J*, vol. 11, nº 8, p. 17–24, 2012.
[185] J. Horvat, B. Klaić, B. Metelko, et V. Šunjić, « Mechanism of levulinic acid formation », *Tetrahedron Lett.*, vol. 26, nº 17, p. 2111‑2114, 1985.
[186] T. Gutiérrez, L. O. Ingram, et J. F. Preston, « Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from< i> Escherichia coli</i> strain LYO1—An enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production », *J. Biotechnol.*, vol. 121, nº 2, p. 154–164, 2006.
[187] J. Zhang, Z. Zhu, X. Wang, N. Wang, W. Wang, et J. Bao, « Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, Amorphotheca resinae ZN1, and the consequent ethanol fermentation », *Biotechnol. Biofuels*, vol. 3, nº 1, p. 26, 2010.
[188] E. Mateos-Espejel, A. Alva-Argaez, L. Savulescu, et J. Paris, « From kraft mills to forest biorefinery: An energy and water perspective. I. Methodology », *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 44, nº 1, p. 15, 2010.
[189] M. Marinova, E. Mateos-Espejel, et J. Paris, « From kraft mills to forest biorefinery: An energy and water perspective. II. Case study », *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 44, nº 1, p. 21, 2010.
[190] M. Marinova, E. Mateos-Espejel, N. Jemaa, et J. Paris, « Addressing the increased energy demand of a Kraft mill biorefinery: The hemicellulose extraction case », *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 87, nº 9, p. 1269‑1275, sept. 2009.

[191] M. Moshkelani, M. Marinova, M. Perrier, et J. Paris, « The forest biorefinery and its implementation in the pulp and paper industry: Energy overview », *Appl. Therm. Eng.*, vol. 50, n° 2, p. 1427–1436, 2013.
[192] « Global rates », *Global-rates*. [En ligne]. Disponible sur: http://fr.global-rates.com/.
[193] « Institut national de la statistique et des études économiques », *Institut national de la statistique et des études économiques*. [En ligne]. Disponible sur: http://www.insee.fr/fr/.
[194] « Boursorama », *Boursorama*. [En ligne]. Disponible sur: www.boursorame.com.

Annexe I : les procédés de détoxification

Les procédés de détoxification ont déjà été abordés dans le chapitre I (partie C.2.3). Il s'agit de procédés utilisés pour réduire le caractère inhibiteur des hydrolysats destinés à être fermentés. Il existe plusieurs traitements pouvant détoxifier un hydrolysat. Le choix du traitement dépend des composés inhibiteurs à éliminer, ainsi que de données économiques.

A. Procédé alcalin (*overliming*)

L'*overliming* est un procédé qui consiste à augmenter le pH de l'hydrolysat à l'aide d'un alcali, jusqu'à obtenir un précipité. Une fois ce précipité éliminé (filtration, centrifugation…), le pH peut de nouveau être ajusté pour la fermentation [142]. Ce procédé permet de réduire la teneur en furanes et composés phénoliques, mais n'a aucun impact positif sur les acides organiques. Le choix de l'alcali, le pH, la durée ainsi que la température du traitement sont les paramètres à choisir judicieusement. Un traitement trop sévère peut être néfaste. En milieu alcalin, les sucres peuvent être dégradés en acide formique (réaction de peeling), mais également en acide acétique et en composés phénoliques [139], [143]. De plus, l'utilisation d'ions inorganiques peut inhiber la fermentation. Il est donc possible d'éliminer furanes et composés phénoliques sans pour autant augmenter la production d'éthanol, du fait de l'impact négatif des ions et de la dégradation des sucres.
L'*overliming* était à l'origine effectué à partir d'hydroxyde de calcium, ou chaux éteinte ($Ca(OH)_2$). Un précipité de sulfate de calcium (gypse, $CaSO_4$) se forme pendant le traitement, sous-produit qu'il faut valoriser. L'*overliming* désigne dorénavant tout traitement alcalin de détoxification, qui peut être effectué également avec de l'ammoniaque (NH_4OH), de l'hydroxyde de magnésium ($Mg(OH)_2$), de l'hydroxyde de baryum ($Ba(OH)_2$), ou de la soude (NaOH).

Une étude menée sur un hydrolysat résultant de l'hydrolyse acide d'épicéa, avec *S. cerevisiae* comme levure, a permis de déterminer l'influence du pH et de la température d'un traitement à l'hydroxyde de calcium durant 3 heures (Tableau 60). L'augmentation de la température et du pH entrainent une hausse de la quantité de furanes et composés phénoliques éliminés, ainsi qu'une augmentation de la quantité de sucres dégradés. Ainsi, dans tous les cas, les concentrations en acides formique et acétique augmentent pendant le traitement. Pour les traitements les plus sévères (pH et températures élevés), les composés phénoliques augmentent également, du fait de la dégradation des sucres, les furanes sont totalement éliminés, au prix de pertes en sucres pouvant être jugées inacceptables. Les meilleurs rendements de fermentation, calculés à partir des sucres fermentescibles présents avant le traitement, sont obtenus pour des réactions à haut pH et à températures intermédiaires (30°C), et bas pH et températures plus élevées (pH 9 et 10, température de 55°C). Le meilleur traitement (30°C, pH 12), permet d'augmenter ce rendement de 20% par rapport à une fermentation sans détoxification. Il a

permis d'éliminer 65% du HMF, 53% du furfural, 12% des composés phénoliques tout en préservant plus de 85% des sucres fermentescibles. L'utilisation de soude ne permet pas d'obtenir d'aussi bons résultats. Au mieux, un rendement supérieur de 11% est obtenu à un pH de 9 et à une température de 80°C (Tableau 60) [144]. La soude est moins néfaste pour les sucres que le $Ca(OH)_2$, mais son pouvoir de détoxification est également plus faible [139], [144].

Le NH_4OH s'avère finalement plus efficace que le $Ca(OH)_2$, la NaOH, le $Mg(OH)_2$ et le $Ba(OH)_2$ [143]. Il préserve la dégradation des sucres, tout en éliminant une quantité significative de furanes et composés phénoliques (Tableau 60). Un traitement à un pH de 9, pour une température de 55°C permet d'éliminer 32% de HMF, 34% de furfural et 13% des composés phénoliques tout en limitant la dégradation des hexoses à 7%. Des traitements plus sévères permettent d'éliminer 50% des furanes en dégradant moins de 8% des hexoses [144]. L'utilisation d'ammoniaque génère en outre un précipité moins important que l'hydroxyde de calcium. Cependant, il possède un pouvoir tampon sur le pH, qui nécessite une consommation plus élevée de réactifs pour retrouver un pH acide préalable à la fermentation.

Il est également possible d'utiliser le sulfite (SO_3^{2-}) pour un traitement alcalin. Ce traitement permet de diminuer la teneur en HMF et furfural [142]. En mettant 1% (w/v) de sulfite de sodium dans un hydrolysat à un pH de 5,5 pendant 1h, les teneurs en HMF et furfural d'un hydrolysat acide d'épicéa sont réduites de 40% [146].

Paramètres traitement			Acides			Furanes		Composés phénoliques	Sucres		Rendement fermentation directe	Rendement fermentation global	Référence
Alkali	pH	Temp. (°C)	Formique	Acétique	Lévulinique	HMF	Furfural		Glucose	Mannose			
Référence			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	[143]
$Ca(OH)_2$	12	5	111	105	85	4	-	-	-	-	-	-	[143]
$Ca(OH)_2$	11	30	143	112	86	35	47	78	85	87	140	120	[143]
$Ca(OH)_2$	12	30	124	109	90	9	5	100	75	76	140	87	[143]
$Ca(OH)_2$	9	55	152	111	86	63	74	58	84	88	130	0	[143]
$Ca(OH)_2$	10	55	169	126	100	18	25	78	74	58	130		[143]
$Ca(OH)_2$	11	55	316	133	80	1	3	125	36	37	140	52	[143]
$Ca(OH)_2$	12	55	20	219	122	<1	<1	201	1	1	-	-	[143]
$Ca(OH)_2$	9	80	126	183	108	62	47	104	83	88	130	98	[143]
NH_4OH	8	55	-	-	-	83	73	93	93	94		109	[144]
NH_4OH	9	42,5	-	-	-	63-67	65-68	100-102	90-93	91-95		103-109	[144]
NH_4OH	9	55	-	-	-	68	66	87	93	94		120	[144]
NH_4OH	10	55	-	-	-	50	43	88	92	93		102	[144]
NH_4OH	10	80	-	-	-	4-11	2-7	12-126	73-75	84-86		99-102	[144]
NaOH	9	80	98	93	-	71	63	88	94	89		111	[144]
NaOH	11	55	102	108	-	<1	<1	127	75	88		82	[144]
NaOH	12	30	99-101	101-103	-	5	5-6	111-114	84-89	95-100		65-80	[144]
NaOH	12	55	133	166	-	0	0	168	35	34		63	[144]

Tableau 60 : Résultats de traitements alcali pour détoxifier un hydrolysat résultant d'une hydrolyse acide sur de l'épicéa. Rendement fermentation direct : rendement calculé sur les hexoses présents à la fin du traitement ; Rendement fermentation global : rendement calculé sur les hexoses présents avant le traitement [143], [144]

B. Résines échangeuses d'anions

L'utilisation de résines échangeuses d'anions permet de purifier l'hydrolysat de la plupart de ses inhibiteurs. Effectuée sur un hydrolysat acide de bagasse de canne à sucre, elle a permis d'éliminer 63,4% des furanes, 75,8% des composés phénoliques et 85,2% de l'acide acétique [145]. Le pH du traitement a une influence capitale sur le résultat. Un pH alcalin augmente le ratio des formes dissociées des acides, qui sont donc éliminées en plus grande quantité par les résines. Pour les mêmes raisons, la quantité de composés phénoliques et furanes éliminée augmente, ainsi que celle des sucres (Tableau 61). Un compromis est donc nécessaire.

pH	Glucose + mannose	Acide lévulinique	Acide acétique	Acide formique	Furfural	HMF	Composés phénoliques
Référence	100	100	100	100	100	100	100
5,5	92	14	11	8	69	74	31
10	74	7	4	3	27	30	9

Tableau 61 : Résultats de traitements sur résines échangeuses d'ions à deux pH différents [146]

La résine échangeuse d'ions est un procédé d'une efficacité redoutable, éliminant en quantité importante tous les inhibiteurs.

C. Charbons actifs

Le procédé aux charbons actifs consiste à mettre en contact un hydrolysat et des charbons actifs. Ce procédé, utilisé pour éliminer les composés phénoliques [147], a montré également une aptitude à diminuer les concentrations en furanes et acide acétique. Le charbon peut être régénéré, par exemple en le mettant quelques heures dans de l'eau bouillante [148]. Appliqué sur de l'hydrolysat acide de bagasse de canne à sucre, il a permis de diminuer les concentrations en furanes, composés phénoliques et acide acétique de 38,7%, 57% et 46,8% respectivement.
De même, mettre en contact un gramme de charbons actifs et 100 mL d'un hydrolysat résultant d'une autohydrolyse ou d'une hydrolyse acide d'eucalyptus pendant 12 heures a permis de réduire la concentration en lignine soluble de 67%, sans affecter significativement les concentrations en sucres [171].
A un ratio plus important d'un gramme pour 5 mL d'hydrolysat, 95% des composés dérivés de la lignine sont retirés [148].

D. Evaporation

L'évaporation a déjà été abordée dans ce chapitre en tant que procédé utilisé pour concentrer un hydrolysat. (cf. partie A.2 de ce chapitre).
Elle permet d'éliminer les acides acétique et formique, le furfural et le HMF. En plus des résultats présentés précédemment, l'évaporation de 10% d'un hydrolysat résultant d'une hydrolyse acide d'épicéa n'a eu qu'un faible impact sur les concentrations de ces inhibiteurs, alors que l'évaporation de 90% de l'hydrolysat a permis d'extraire, 65% d'acide acétique, 74% d'acide formique et 100% du furfural [146]. Par ailleurs, laisser bouillir 3h un hydrolysat d'eucalyptus (explosion à la vapeur) en maintenant le volume constant par ajout d'eau, a permis de faire chuter la concentration d'acide acétique de 31,2 à 1,0 g/L [148].

E. Détoxification par voie enzymatique

Des enzymes peuvent être utilisées pour transformer les composés inhibiteurs en composés moins toxiques pour les levures. Les plus utilisées sont les laccases. Celles-ci permettent d'éliminer les composés phénoliques, *a priori* en les faisant polymériser [142], mais n'a pas d'effet sur les autres inhibiteurs [146]. Un traitement avec ces enzymes a permis de diminuer de 80% la teneur en composés phénoliques d'un hydrolysat résultant d'une hydrolyse acide d'épicéa [146]. Des résultats similaires ont été obtenus sur de l'hydrolysat acide de bagasse de canne à sucre [145], [147].

F. Détoxification biologique

Il est possible d'utiliser des microorganismes pour détoxifier des hydrolysats. Ils peuvent produire des laccases, efficaces sur les composés phénoliques (voir ci-dessus), comme *Trametes versicolor* [142] ou *Cyathus stercoreus* [145].
D'autres microorganismes peuvent avoir un comportement similaire à *S. cerevisiae*, en transformant HMF et furfural en 2,5-bis-hydroxymethylfuran et alcool furfurylique [47]. *Trichoderma reesei* fait l'objet de beaucoup d'études. Placée dans un hydrolysat, cette bactérie a permis de réduire les concentrations en acide acétique, furfural et de dérivés d'acide benzoïque [142]. Dans une autre étude, ce procédé a permis de diminuer les concentrations en HMF et furfural de 25% et 85% [146]. Une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* (LYO1) a eu un impact positif sur la concentration en furfural [186]. *Amorphotheca resinae* ZN1, un champignon génétiquement modifié peut, quant à lui, réduire les concentrations en acide acétique, acide formique, HMF et furfural [187].

G. Addition de produits chimiques

Certains produits chimiques, ajoutés dans un milieu de fermentation inhibé, ont la capacité d'augmenter les rendements de fermentation en diminuant la nocivité des inhibiteurs. L'ajout de dithionite ($S_2O_4^{2-}$) à 5 et 10 mM a permis d'améliorer les rendements de fermentation d'un hydrolysat [149], bénéficiant du pouvoir oxydant de cet anion. Le sulfite, déjà évoqué lors du traitement alcali (voir plus haut), possède la même propriété.
Certains composés peuvent directement agir sur la levure, comme le tréhalose, qui protège la membrane, ou la glutathion [47].

H. Conclusion sur les traitements de détoxification

L'ajout d'un procédé de détoxification peut nuire à la rentabilité globale du procédé. S'il est inévitable d'en appliquer, le choix du procédé dépend des inhibiteurs les plus néfastes présents dans l'hydrolysat et du coût de sa mise en œuvre. Il est également possible d'utiliser plusieurs procédés successivement. Le Tableau 62, rappelé ci-dessous, montre l'efficacité relative de chaque traitement sur les inhibiteurs.

Traitement	HMF	Furfural	Acide acétique	Acide formique	Acide lév.	Composés phénoliques	Dégradation des sucres
$Ca(OH)_2$	++	++	-	-	0	+	++
NH_4OH	+++	+++				++	+
NaOH	+	+	0	0		+	+
Résines	+	+	+++	+++	+++	+++	+
Charbons actifs	+	++	+		+++	+	
Evaporation	+	+++	++	++			0
Laccases	0	0	0	0	0	+++	0
T. reessei	+	++	0	0	0	0	
A. resinae	++	++	++	++			

Tableau 62 : Effets relatifs des différents procédés de détoxification sur les inhibiteurs

Annexe II : Détails de l'étude technico économique

A. Etude d'un procédé utilisant l'extraction en milieu quasi-neutre

Description du procédé :

Le procédé global est décrit sur la Figure 102. Ses principales étapes sont :

- L'extraction des hémicelluloses avec de la liqueur verte diluée (3% d'alcali) en présence également d'anthraquinone (0,05% par rapport au bois)
- La concentration de l'hydrolysat dans une série de *flash tanks*, une partie est recyclée vers l'étape d'extraction
- Le lavage des copeaux. Les eaux de lavage, contenant des hémicelluloses solubilisées, sont ensuite mélangées à l'hydrolysat
- L'hydrolyse acide de cet hydrolysat (2,84 % (w/w) d'acide sulfurique, soit un pH de 1, à 126°C pendant 1,3 h)
- Une étape de filtration permettant d'éliminer la lignine qui a précipité lors de l'hydrolyse acide
- Une extraction liquide-liquide permettant d'extraire l'acide acétique et le furfural de l'hydrolysat (l'acide acétique fermenté à partir des acides uroniques est renvoyé ici pour être purifié)
- La neutralisation du pH par ajout de chaux vive (CaO). Le gypse formé est éliminé par filtration
- La fermentation des hexoses et pentoses en éthanol par *E. coli* KO11 (cf. chapitre 1, partie C.2.2) et des acides glucuroniques par *E. coli* B.
- La purification de l'éthanol par distillations, puis déshydratation sur tamis moléculaire

Les données utilisées lors du prétraitement et de la cuisson kraft sont résumées dans le Tableau 63. La NNE n'est pas un procédé suffisamment sévère pour permettre d'extraire une quantité importante d'hémicelluloses. Par exemple, seuls 20 % des xylanes sont extraits. L'avantage de ce procédé est d'avoir un rendement global (prétraitement et cuisson kraft) quasiment identique avec ou sans l'extraction des hémicelluloses. Avec une même consommation de bois, la production de pâte non blanchie finale est donc similaire. De plus, la qualité de la pâte n'est quasiment pas affectée.
Le recyclage de l'hydrolysat couplé aux *flash tanks* permet d'obtenir une concentration totale en matière sèche dans l'hydrolysat de 8,5%, soit une concentration en sucres fermentescibles de 24,5 g/L, et ce malgré le lavage des copeaux. Ce dernier permet en outre de récupérer 80% des hémicelluloses extraites.

		Référence	Procédé modifié
Prétraitement	Alcali		3%
	Temps montée en température		60 min
	Temps à température		110 min
	Température		160 °C
	Facteur H		800
	Matériau extrait (g/ 100 g de bois)		10,50%
	➢ Pentosanes (g/ 100 g de bois)		1,95%
	➢ Hexosanes (g/ 100 g de bois)		0,50%
	➢ Lignine (g/ 100 g de bois)		0,73%
Cuisson kraft	Alcali	15%	12%
	Sulphidité	30%	30%
	Temps montée en température	70 min	7 min
	Temps à température	230 min	143 min
	Température	170°C	170°C
	Facteur H	1500	700
	Indice kappa final	16	16
	Rendement cuisson	47,0%	52,3%
	Rendement global	47,0%	46,8%
	Production éthanol kg/ T bois		18,8
	Production éthanol kg/ T pâte		39,5

Tableau 63 : Données relatives au prétraitement et aux cuissons lors du procédé NNE [172]

Des études ont été effectuées suite à celle-ci pour optimiser la consommation énergétique de l'usine modèle utilisée [188]–[191]. Il s'agit avant tout de l'optimisation du procédé kraft, c'est pourquoi les résultats ne seront pas détaillés ici.

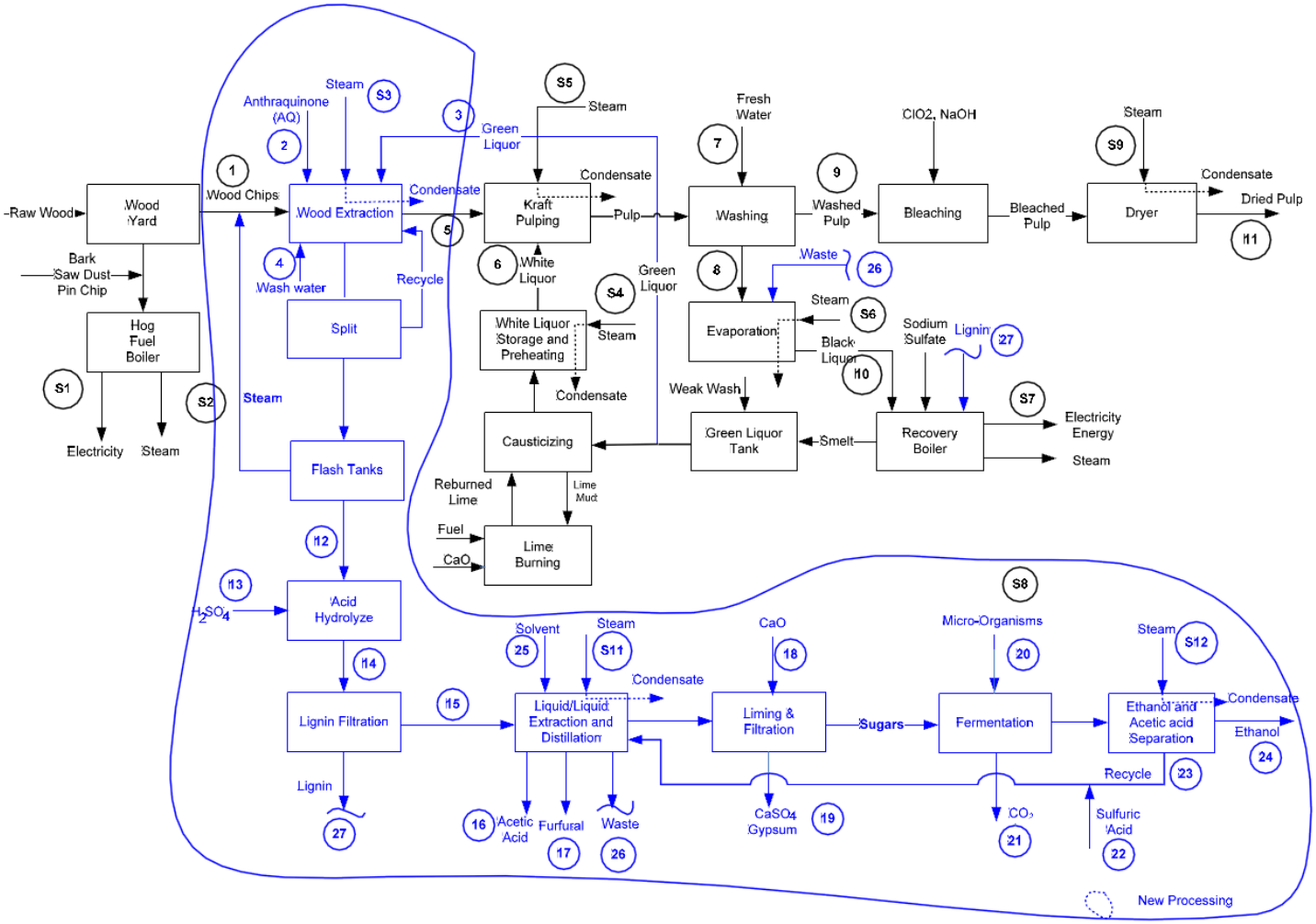


Figure 102 : Procédé de production d'éthanol et d'acide acétique dans une usine kraft selon Mao [78]

B. Etude d'un procédé utilisant l'extraction alcaline des hémicelluloses

Description du procédé :

Les différentes étapes du procédé sont :

- L'extraction à la soude des hémicelluloses
- La nanofiltration de l'hydrolysat, permettant de concentrer les hémicelluloses extraites, et de recycler la soude vers l'extraction
- L'hydrolyse secondaire de l'hydrolysat, effectuée avec 1,1% d'acide sulfurique à 190°C pendant 2 min
- La concentration de l'hydrolysat, en le faisant passer dans un *flash tank* et qui permet en outre d'extraire une partie de l'acide acétique, du furfural et de l'HMF.
- La détoxification de l'hydrolysat par *Overliming* avec de la chaux vive à pH 10, suivie de la neutralisation et de la filtration du gypse
- La fermentation des hexoses et pentoses avec une souche de *Zymomonas mobilis*

Les données relatives à l'extraction et aux cuissons kraft sont résumées dans le Tableau 64. Les résultats d'extraction sont relativement similaires à ceux du procédé NNE précédent, avec 10,9% de matériau extrait, mais seulement 17% des xylanes. Le rendement global du procédé avec extraction est légèrement plus faible que le témoin, ce qui indique que la production de pâte sera également inférieure, à quantité de bois égale. Néanmoins, ce procédé démontre les mêmes avantages que la NNE : un réactif disponible dans une usine kraft et une qualité de pâte inchangée après l'extraction.

		Référence	Procédé Modifié
Prétraitement	% NaOH / bois		26,7%
	Temps extraction		4h
	Température		90°C
	Matériau extrait (g / 100g de bois)		10,90%
	➢ Pentosanes (g / 100g de bois)		3,01%
	➢ Hexosanes (g / 100g de bois)		1,37%
	➢ Lignine (g / 100g de bois)		1,70%
Cuisson kraft	Alcali	21%	12%
	Sulphidité	25%	40%
	Temps montée en température	40 min	40 min
	Temps à température	35 min	35 min
	Température	170°C	170°C
	Facteur H	614	461
	Indice kappa final	23,1	23,3
	Rendement cuisson	53,6%	54,0%
	Rendement global	53,6%	48,1%
	Production éthanol kg/ T bois		18,36
	Production éthanol kg/ T pâte		38,16

Tableau 64 : Données relatives au prétraitement et aux cuissons lors du procédé à la soude [39]

C. Etude d'un procédé utilisant l'hydrolyse acide des hémicelluloses

Description du procédé :

Les différentes étapes du procédé sont:

- L'hydrolyse acide des hémicelluloses (plusieurs sévérités ont été appliquées)
- Le lavage des copeaux avant l'étape de cuisson kraft (les eaux de lavage ne sont pas valorisées, les sucres qu'elles contiennent sont perdus)
- L'évaporation de l'hydrolysat dans des *flash tanks* pour être concentré et en retirer une partie de l'acide acétique, du HMF et du furfural
- La détoxification de l'hydrolysat en le faisant passer dans une résine échangeuse d'ions
- L'ajustement du pH de l'hydrolysat avec de la chaux vive pour la fermentation, le gypse qui en résulte étant retiré
- La fermentation des hexoses et des pentoses
- La purification de l'éthanol, qui subit deux distillations successives avant d'être déshydraté sur tamis moléculaire

Les caractéristiques du procédé modifié sont résumées dans le Tableau 65. La sévérité du traitement permet de retirer entre 6 et 18% du bois. Il n'y a pas de données disponibles sur la cuisson kraft de référence (sans prétraitement) si ce n'est son rendement, qui est de 46,6%.

Contrairement aux traitements alcalins, le rendement de la cuisson kraft après prétraitement est plus faible que le rendement témoin. Ce rendement diminue quand la quantité de bois extraite augmente. Les hémicelluloses résiduelles et dans une moindre mesure la cellulose sont en effet plus sensibles à la cuisson, et une plus grande partie de ces constituants est perdue pour atteindre l'indice kappa cible.

		Procédé Modifié			
Prétraitement	% H_2SO_4 / bois	0,5 à 1%			
	Temps extraction	30 à 60 min			
	Température	150°C			
	Bois extrait	6%	10%	14%	18%
Cuisson kraft	Alcali	16%			
	Sulphidité	30%			
	Température	165°C			
	Facteur H	1294			
	Indice kappa final	18-20			
	Rendement cuisson	46,1%	44,5%	42,4%	40,0%
	Rendement global	43,3%	40,1%	36,5%	32,8%
Production éthanol kg/ T bois		19,2	32,2	45,0	57,5
Production éthanol kg/ T pâte		44,4	80,6	123,2	175,5

Tableau 65 : Données relatives aux hydrolysats acides et aux cuisson krafts (d'après [67])

Annexe III : Calculs économiques

Les résultats économiques donnés dans les Tableaux 47 et 48 (chapitre IV, partie B.4) sont basés sur les hypothèses données dans le Tableau 46 pour les productions d'éthanol et de pâte non blanchie. Les coûts de production en éthanol et les hypothèses économiques liées sont basés sur la partie B.3.2 du chapitre IV, le cas permettant d'extraire 14% du bois ayant été pris en exemple. Il a été fait l'hypothèse que le rendement du blanchiment de la pâte ayant subi une extraction (pâte blanchie obtenue pour 100 g de pâte non blanchie) est de 95% pour obtenir de la pâte à dissoudre. L'amortissement des investissements est calculé sur 10 ans. Tous les résultats sont donnés en dollars de 2012, cette année correspondant aux données les plus récentes utilisées pour les prix de pâte kraft, pâte à dissoudre et éthanol. La conversion en dollars est effectuée selon l'inflation subie par les États-Unis et résumée dans le Tableau 66. Ainsi par exemple, le coût de production de d'éthanol, de 647 $\$_{2008}/m^3$ en 2008 est de 704 $\$_{2012}/m^3$.

Année	Inflation
2008	3,981%
2009	-0,384%
2010	2,314%
2011	2,682%
2012	2,651%
2013	1,474%

Tableau 66 : Inflation aux Etats-Unis de 2008 à 2013 [192]

Les cours de la pâte kraft de résineux (NBSK *pulp* pour *Northern bleached softwood kraft pulp*) [193] et de la pâte à dissoudre [29] ont été relevés entre 2008 et 2012, en prenant le cours moyen tous les ans (Figure 103). Il existe différents grades de pâte à dissoudre, dont les prix diffèrent. Dans cette étude, ces grades n'ont pas été différenciés, une moyenne globale ayant été utilisée. La différence maximale entre les deux est de 355 $/T (en 2012) et la minimale 127 $/T (en 2010), ce qui représente les deux cas considérés.

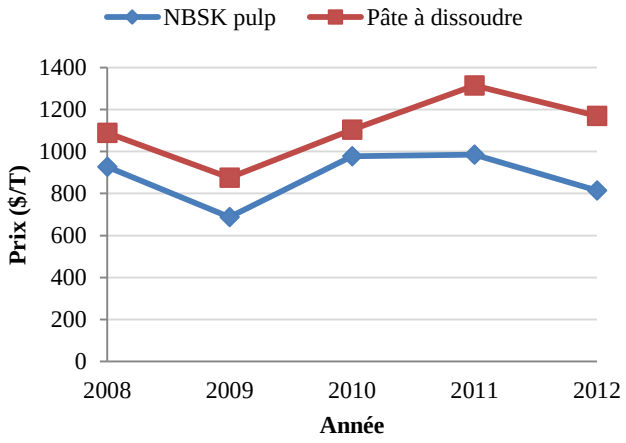


Figure 103 : Cours la pâte blanchie de résineux (NBSK) et de pâte à dissoudre en dollar constant de 2012

Le prix de l'éthanol choisi est de 610 $/m^3, valeur moyenne sur l'ensemble de l'année 2012 [194].

Ces hypothèses ont permis de déterminer les résultats donnés dans la partie B.4 du chapitre IV.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

RESUME

Mots clés : Hémicelluloses, éthanol, extraction, fermentation, bioraffinerie

La réduction de la consommation des carburants fossiles est l'un des enjeux majeurs du XXIème siècle. Le bioéthanol représente une alternative durable à l'essence, mais sa production est limitée puisqu'il est produit à partir de ressources alimentaires. L'éthanol de seconde génération offre une alternative pour relancer son développement. Encore au stade expérimental, il serait produit à partir de biomasse lignocellulosique (bois, paille, plantes annuelles..) et donc ne concurrencerait pas l'alimentation humaine. Cette thèse s'inscrit dans le cadre de production d'éthanol de 2nde génération dans une usine de pâte kraft. Dans ces usines, les hémicelluloses, qui représentent 20 à 30% du bois, ne sont pas valorisées. Cette étude porte sur l'extraction de ces hémicelluloses en amont du procédé et de leur fermentation en éthanol. Elle consiste à la mise au point et l'optimisation d'un procédé global allant du copeau de bois à l'éthanol.

ABSTRACT

Key words: Hemicelluloses, ethanol, extraction, fermentation, biorefinery

Decreasing the consumption of crude oil derivatives has become one of the main world issues of the 21st century. The only green substitute for gasoline potentially available in large quantities today is bioethanol, but its production has to be limited as it is produced from crops. It is therefore important to develop the production of second generation ethanol, which consists in using lignocellulosic biomass as raw material to avoid to compete with food resources. Second generation ethanol is still at experimental scale nowadays. This thesis deals with the specific case of the production of ethanol from hemicelluloses in a kraft pulp mill. In pulp mills, hemicelluloses, which make up 20 to 30% of the wood, are not value added. It is proposed to extract them from wood prior to the kraft treatment and to ferment them into ethanol. The study talks more specifically of the optimisation of the global process from the woodchip to the ethanol.